

**Zur Chemie und Immunologie
neuer Alkylamide
und anderer Inhaltsstoffe
aus *Echinacea purpurea*,
Echinacea angustifolia
und *Echinacea pallida***

Peter Remiger

Disbui. München

1989



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0031

Zur Chemie und Immunologie neuer Alkylamide
und anderer Inhaltsstoffe aus Echinacea purpurea,
Echinacea angustifolia und Echinacea pallida

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Peter Remiger
aus
München

November 1988

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Wagner
2. Berichterstatter : Prof. Dr. E. Reimann
Tag der mündlichen Prüfung : 30.1.1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

	Einleitung	1
1.	Allgemeiner Teil	2
1.1.	Systematische und botanische Beschreibung	2
1.1.1.	Echinacea angustifolia	2
1.1.2.	Echinacea pallida	5
1.1.3.	Echinacea purpurea	5
1.2.	Volkmedizinische und therapeutische Anwendung	7
1.3.	Verfälschungs- und Verwechslungsproblematik der Echinacea-Drogen	9
1.4.	Beschreibung und Charakterisierung bisher bekannter Inhaltsstoffe	10
1.4.1.	Alkylamide	11
1.4.2.	Polyacetylene (Polyine) und Polyene	12
1.4.3.	Kaffeesäurederivate	13
1.4.4.	Flavonoide	14
1.4.5.	Sonstige Inhaltsstoffklassen	14
1.5.	Bisheriger Stand der Analytik	15
2.	Isolierung und Identifizierung phenolischer Verbindungen aus Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia	16
2.1.	Voruntersuchungen	16
2.1.1.	Dünnschichtchromatographie	16
2.1.2.	Hochleistungsflüssigchromatographie	19
2.2.	Isolierung der Verbindungen H1 und H2	19
2.2.1.	Extraktion und Anreicherung	22
2.2.2.	Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)	22
2.2.3.	Abtrennung der Phosphorsäure aus dem Isolierungsansatz	24
2.3.	Identifizierung und Strukturaufklärung	26
2.3.1.	Verbindung H1 : Cichoriensäure	26
2.3.1.1.	UV- und IR-Spektroskopie	26
2.3.1.2.	FAB-Massenspektroskopie	27
2.3.1.3.	¹ H-NMR-Spektroskopie.	27
2.3.1.4.	Stereochemie	30
2.3.2.	Verbindung H2 : 2-Caffeoyl-weinsäure	31
2.3.2.1.	UV- und IR-Spektroskopie	31
2.3.2.2.	FAB-Massenspektroskopie	31

2.3.2.3.	¹ H-NMR-Spektroskopie	31
2.3.2.4.	Stereochemie	34
2.3.3.	Verbindung H3 : Rutin	34
2.3.4.	Verbindung H4 : Cichoriensäuremethylderivat	35
2.3.5.	Verbindung H5, H6 und H7 : Isochlorogensäuren und Chlorogensäure	35
2.3.6.	Verbindung H9 : Echinacosid	37
2.3.7.	Verbindung H8 : Verbascosid	37
2.3.8.	Verbindung H10 : Cynarin	39
3.	Isolierung und Strukturaufklärung von Alkylamiden aus den Wurzeln von Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia . .	41
3.1.	Voruntersuchungen	41
3.1.1.	Dünnschichtchromatographie	41
3.1.2.	Hochleistungsflüssigchromatographie	42
3.1.3.	Wasserdampfdestillation und TAS-Verfahren	45
3.2.	Isolierung der Alkylamide	46
3.2.1.	Echinaceae purpureae radix	46
3.2.1.1.	Extraktion	46
3.2.1.2.	Niederdruck-Säulenchromatographie	47
3.2.1.3.	Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) und semipräparative HPLC	47
3.2.2.	Echinaceae angustifoliae radix	48
3.3.	Strukturaufklärung der Alkylamide	50
3.3.1.	Alkylamide aus Echinaceae purpureae radix	50
3.3.1.1.	P6 : Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	50
3.3.1.2.	P1 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	58
3.3.1.3.	P3 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid	60
3.3.1.4.	P8 : Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid	61
3.3.1.5.	P7 : Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid	62
3.3.1.6.	P9 : Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid	69
3.3.1.7.	P4 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid	71
3.3.1.8.	P5 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid	74
3.3.1.9.	P2 : Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid	75
3.3.2.	Alkylamide aus Echinaceae angustifoliae radix	79
3.3.2.1.	A1 : Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid	79
3.3.2.2.	A7 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid	81
3.3.2.3.	A2 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid	83
3.3.2.4.	A4 : Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid	84
3.3.2.5.	A5 : Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid	86

3.3.2.6.	A9 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid	87
3.3.2.7.	A3 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid	89
3.3.2.8.	A6 : Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid	91
3.3.2.9.	A10: Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid	94
3.3.2.10.	Weitere Isobutylamide aus Echinaceae angustifoliae radix	96
4.	Isolierung und Strukturaufklärung eines Sesquiterpenalkohols aus dem frischen Kraut von Echinacea purpurea	97
4.1.	Voruntersuchungen	97
4.1.1.	Dünnschichtchromatographie	97
4.1.2.	Hochleistungsflüssigchromatographie	98
4.2.	Isolierung	98
4.2.1.	Extraktbereitung	98
4.2.2.	Säulenchromatographie	98
4.2.3.	Semipräparative HPLC	100
4.3.	Strukturaufklärung	100
4.3.1.	UV- und IR-Spektroskopie	100
4.3.2.	EI- und CI-Massenspektroskopie	101
4.3.3.	¹ H-NMR-Spektroskopie.	102
4.3.4.	COSY-NMR-Spektroskopie	103
4.3.5.	¹³ C-NMR-Spektroskopie	104
4.3.6.	¹ H- ¹³ C-Korrelations-Spektroskopie	104
4.3.7.	NOE-Experimente	104
4.3.8.	Stereochemie	111
5.	Vergleichende analytische HPLC-Untersuchungen von Echinacea- Extrakten und Fertigpräparaten	112
5.1.	Trennsysteme	112
5.2.	Analytik der hydrophilen Inhaltsstoffe	113
5.2.1.	Oberirdische Teile	113
5.2.2.	Wurzeln	115
5.2.3.	Gehaltsbestimmung der Cichoriensäure	115
5.3.	Analytik der lipophilen Inhaltsstoffe	119
5.3.1.	Oberirdische Teile	119
5.3.2.	Wurzeln	121
5.3.3.	Gehaltsbestimmung der Dodeca-2,4,8,10-tetraensäure-isobutylamide	124
5.4.	Untersuchung von homöopathischen Urtinkturen	125
5.5.	Untersuchung von Echinacea-Fertigpräparaten	128
5.6.	Analytik der Arzneibücher	134
5.7.	Stabilitätsuntersuchungen	135

6.	Pharmakologische Untersuchungen	138
6.1.	Bisherige immunologische Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten und -präparaten	138
6.2.	Beschreibung der verwendeten Testsysteme	139
6.2.1.	Granulozyten-Ausstrichtest nach BRANDT	139
6.2.2.	Chemolumineszenz-Test	139
6.2.3.	Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI	140
6.3.	Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen	140
6.3.1.	Testung der Inhaltsstoffe der hydrophilen Fraktion	143
6.3.2.	Testung der Inhaltsstoffe der lipophilen Fraktion	145
7.	Zusammenfassung	149
8.	Experimenteller Teil	153
8.1.	Herkunft der Drogen und Vergleichssubstanzen	153
8.2.	Chromatographische Arbeitsmethoden	154
8.2.1.	Dünnschichtchromatographie	154
8.2.2.	Säulenchromatographie	155
8.2.3.	Flash-Chromatographie	156
8.2.4.	Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)	156
8.2.5.	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	156
8.2.5.1.	Analytische HPLC	156
8.2.5.2.	Semipräparative HPLC	157
8.2.5.3.	Probenvorbereitung	158
8.3.	Spektroskopische und physikalische Methoden	159
8.4.	Isolierungen	160
8.4.1.	Isolierung von Cichoriensäure und 2-Caffeoyl-weinsäure	160
8.4.2.	Isolierung der Alkylamide aus Echinaceae purpureae radix	161
8.4.3.	Isolierung der Alkylamide aus Echinaceae angustifoliae radix	162
8.4.4.	Isolierung des Germacrenalkohols	163
8.5.	Quantitative Bestimmungen	163
8.5.1.	Gehaltsbestimmung der Cichoriensäure	163
8.5.2.	Gehaltsbestimmung der Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide	165
8.6.	Aufstellung der untersuchten Fertigpräparate	166
8.7.	Physikalische Daten	167
8.8.	Pharmakologische Untersuchungen	179
8.8.1.	Carbon-Clearance-Test	179
8.8.2.	Granulozyten-Ausstrichtest	180
8.8.3.	Chemolumineszenz-Test	180
9.	Literatur	182

Einleitung

Die Anwendung von Echinacea-Drogen als Heilpflanzen hat eine lange Tradition, deren Anfänge bis zu den indianischen Ureinwohnern Nordamerikas zurückreichen [1]. In der heutigen Therapie werden Extrakte aus Echinacea-Drogen sehr häufig zur Steigerung der körpereigenen Abwehrkräfte im Sinne einer unspezifischen Immunstimulierung eingesetzt.

Obwohl in der Vergangenheit eine Vielzahl chemischer Verbindungen aus Echinacea purpurea und Echinacea angustifolia isoliert wurden, ist immer noch unklar, welche Verbindungen für die immunstimulierende Wirkung verantwortlich sind. Die kürzlich in unserem Arbeitskreis isolierten hochmolekularen Polysaccharide [2,3,4] konnten als das immunologisch wirksame Prinzip wäßriger Extrakte aus Echinacea purpurea identifiziert werden. Die Wirkung der im Handel befindlichen Arzneipräparate, die zum überwiegenden Teil aus alkoholischen Extrakten bestehen, kann dadurch aber nicht erklärt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, in den medizinisch verwendeten Drogenarten Echinacea purpurea, Echinacea angustifolia und Echinacea pallida weitere mögliche Wirksubstanzen aufzufinden und strukturell aufzuklären.

Da neuere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis gezeigt haben, daß ein großer Teil der auf dem Markt befindlichen Echinacea-Drogen und -extrakte verfälscht sind bzw. daß einzelne Echinacea-Arten miteinander verwechselt werden, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, geeignete analytische Methoden zur chemischen Standardisierung und zur zweifelsfreien Identifizierung und Unterscheidung der einzelnen Echinacea-Arten und -drogenteile, sowie der im Handel befindlichen Präparate zu entwickeln.



1. Allgemeiner Teil

1.1. Systematische und botanische Beschreibung

Die zur Familie der Asteraceen zählende Gattung *Echinacea* umfaßt neun Arten und zwei Varietäten (Tab.1), wovon jedoch nur *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* medizinische Verwendung finden. Die taxonomische Einteilung dieser Gattung gestaltete sich in der Vergangenheit als schwierig und führte häufig zu wissenschaftlichen Kontroversen. Die Ursachen dafür liegen vermutlich im Auftreten von Übergangsformen zwischen den einzelnen Arten als Folge von Bastardisierungen.

Die Droge war früher auch unter den Bezeichnungen *Brauneria* und *Rudbeckia* bekannt. Der heutige Gattungsname *Echinacea* MOENCH [griech. echinos : Igel (wegen der charakteristischen Blütenform)] geht auf eine botanische Klassifizierung von Conrad Moench aus dem Jahr 1794 zurück und wurde erst spät im 20. Jahrhundert allgemein anerkannt. Die derzeit gültige taxonomische Einteilung basiert vor allem auf Arbeiten von MCGREGOR [5].

Heimat der Pflanzen ist das mittlere und östliche Nordamerika. Sie werden jedoch mittlerweile auch in Mitteleuropa und der UdSSR kultiviert.

1.1.1. *Echinacea angustifolia*

Echinacea angustifolia DC. wurde erstmals im Jahr 1836 von DE CANDOLLE [6] beschrieben. Eine frühere synonyme Bezeichnung der Droge ist *Brauneria angustifolia* HELLER. Im deutschen Sprachgebrauch ist sie unter den Namen "schmalblättriger Sonnenhut", "schmalblättrige Kegelblume" und "schmalblättriger Igelkopf" bekannt.

CRONQUIST [7] betrachtete 1955 *E. angustifolia* als Varietät von *Echinacea pallida* ("*Echinacea pallida* var. *angustifolia* CRONQUIST"). Nach der letzten taxonomischen Bearbeitung der Gattung durch MCGREGOR [5] handelt es sich bei *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* jedoch zweifelsfrei um zwei eigenständige Arten.

Tab.1 : Arten und Varietäten der Gattung *Echinacea* nach McGREGOR [5]

<i>Echinacea angustifolia</i> DC. var. <i>angustifolia</i> <i>Echinacea angustifolia</i> DC. var. <i>strigosa</i> McGREGOR
<i>Echinacea atrorubens</i> NUTT.
<i>Echinacea laevigata</i> (BOYNTON & BEAGLE) BLAKE
<i>Echinacea purpurea</i> (L.) MOENCH
<i>Echinacea pallida</i> (NUTT.) NUTT.
<i>Echinacea paradoxa</i> (NORTON) BRITTON var. <i>paradoxa</i> <i>Echinacea paradoxa</i> (NORTON) BRITTON var. <i>neglecta</i> McGREGOR
<i>Echinacea simulata</i> McGREGOR
<i>Echinacea sanguinea</i> NUTT.
<i>Echinacea tennesseensis</i> (BEADLE) SMALL

Echinacea angustifolia ist eine 10-60 cm hohe Pflanze, deren Stengel einfach oder manchmal verzweigt sind. Die Blätter besitzen eine lanzettliche Form und sind ganzrandig. Die Blütenköpfe sind 1,5-3 cm hoch. Am unteren Rand der stacheligen Röhrenblüten setzen die blaß purpur- bis rosafarbenen Zungenblüten an, die 2-4 cm lang und abstehend sind. Die Farbe der Pollen ist goldgelb. Die Chromosomenzahl beträgt 22 ($n=11$; diploid).

Die hellbraunen, kräftigen Pfahlwurzeln sind 5-20 cm lang und zeigen im mikroskopischen Bild typische Gruppen von Steinzellen und Sklerenchymfasern sowie Phytomelaninauflagerungen. Ölbehälter sind sowohl im Stengel als auch in der Wurzel jeweils nur außerhalb des Zentralzylinders vorhanden. Genauere Angaben finden sich bei [5,8].



Abb.1 : Habituszeichnung von *Echinacea angustifolia* DC. (Dr. G. Heubl ,
Institut für Systematische Botanik der Universität München)

1.1.2. Echinacea pallida

Über *Echinacea pallida* (NUTT.) NUTT. (Synonyme: *Echinacea angustifolia* HOOK, *Rudbeckia pallida* NUTT., *Brauneria pallida* BRITT., *Echinacea pallida* f. *albida* STEY-ERM.) wurde erstmals 1834 von NUTTALL [9] berichtet. HOOK beschrieb *E. pallida* 1861 irrtümlicherweise als "*Echinacea angustifolia*". Die deutschen Bezeichnungen sind "bläufarbener Sonnenhut", "bläufarbene Kegelblume" und "bläufarbener Igelkopf".

Der Habitus von *Echinacea pallida* und *Echinacea angustifolia* ist ähnlich, jedoch gibt es einige botanische Unterschiede zwischen beiden Pflanzen. *Echinacea pallida* erreicht eine Wuchshöhe von 60-120 cm und besitzt einfache, selten verzweigte Stengel. Die ganzrandigen Blätter sind lanzettlich geformt und werden im unteren Teil bis zu 35 cm lang. Die im Vergleich zu den beiden anderen Arten sehr langen Zungenblüten (4-9 cm) sind von purpurroter bis bläuvioletter Farbe und hängend. Die Pollenfarbe ist weißlich. Die Chromosomenzahl beträgt 44 ($n=11$; tetraploid).

Das Wurzelsystem besteht aus hellbraunen, 5-30 cm langen Pfahlwurzeln mit zahlreichen Seitenwurzeln, ähnlich dem von *E. angustifolia*. Es finden sich hier ebenso Phytomelaninauflagerungen sowie Steinzellen und Sklerenchymfasern, die jedoch meist einzeln vorliegen. Ölbehälter sind in ober- und unterirdischen Teilen sowohl innerhalb als auch außerhalb des Zentralzylinders zu finden [8].

1.1.3. Echinacea purpurea

Echinacea purpurea war die erste *Echinacea*-Art, über die in der Literatur berichtet wurde. Sie wurde bereits 1699 unter dem Namen *Dracunculus virginianus* von MORISON [10] beschrieben. Die heutige Bezeichnung *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH stammt von Conrad Moench aus dem Jahre 1794 [11]. Andere Bezeichnungen der Droge waren *Chrysanthemum americanum* PLUK., *Rudbeckia purpurea* L., *Brauneria purpurea* (L.) BRITTON, *Echinacea intermedia* LINDL., *Echinacea speciosa* PAXT., *Rudbeckia serotina* SWEET. und *Rudbeckia hispida* HOFFMGG.. Die deutschen Namen der Pflanze sind "purpurfarbener Sonnenhut", "purpurfarbene Kegelblume" und "purpurfarbener Igelkopf".



Abb. 2 : Habituszeichnung von *Echinacea pallida* (NUTT.) NUTT. (Dr. G. Heubl,
Institut für Systematische Botanik der Universität München)

Echinacea purpurea weist einige charakteristische morphologische Unterschiede zu den beiden vorher genannten Arten auf. Die Pflanze ist ein häufig verzweigtes Staudengewächs, das eine Höhe von 60-180 cm erreicht. Die eiförmigen Blätter sind bis zu 25 cm lang und besitzen einen gesägten Rand. Die purpurroten Zungenblüten sind 4-6 cm lang und abstehend bis hängend. Die Pollenfarbe ist gelb. Die Chromosomenzahl beträgt 22 ($n=11$; diploid). Die ca. 0,5 cm langen Röhrenblüten zeigen einen orangefarbenen Schimmer, was die blühende Pflanze bereits auf den ersten Blick von den anderen Arten unterscheidet.

Der rotbraune Wurzelstock ist 5-30 cm lang und weist zahlreiche kleine, stark verzweigte Faserwurzeln auf, worin er sich deutlich von *E. angustifolia* und *E. pallida* unterscheidet. Steinzellen und Sklerenchymfasern fehlen meist oder liegen einzeln vor. Phytomelaninauflagerungen sind nicht vorhanden. Ölbehälter finden sich in der Rindenschicht der Wurzel, im Stengel dagegen innerhalb und außerhalb des Zentralzylinders [8].

1.2. Volksmedizinische und therapeutische Anwendung

Die ersten Anwendungen der Echinacea-Pflanze für medizinische Zwecke sind von der indianischen Urbevölkerung Nordamerikas überliefert [1]. Je nach Verbreitungsgebiet wurden damals die Wurzeln von *E. angustifolia*, *E. pallida* und *E. purpurea* bei Schlangenbissen, fieberhaften Erkrankungen, Verdauungsstörungen, zur Unterstützung der Wundheilung und gegen Geschlechtskrankheiten angewandt [1,12].

Gegen Ende des letzten Jahrhunderts wurde die Echinacea-Droge in die medizinische Therapie Nordamerikas eingeführt, wobei vor allem alkoholische Wurzelextrakte von *Echinacea angustifolia* verwendet wurden. Die zum Teil euphorischen Berichte schildern Anwendungserfolge bei Tumor- und Syphiliserkrankungen sowie Magengeschwüren, Fieber, Tollwut, Bienenstichen und Schlangenbissen [5,12,13].

In der heutigen Therapie werden Zubereitungen aus Echinacea-Drogen eingesetzt bei grippalen Infekten, fieberhaften Zuständen, chronischen Erkrankungen mit mangelnder körpereigener Abwehrreaktion und zur adjuvanten Krebstherapie. Ferner werden Echinacea-Extrakte in der Urologie [14,15,16], bei Hauterkrankungen [17, 18,19,20,21,22] sowie in der Kinderheilkunde [23,24] verwendet.



Abb.3 : Habituszeichnung von *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH (H.A. GLEASON, New Britton & Brown, Illustrated Flora of the North-Eastern United States and Adjacent Canada 3, 348, The New York Botanical Garden (1952)

Es gibt derzeit auf dem Arzneimittelmarkt rund 250 Zubereitungen aus Echinacea-Drogen, wovon etwa 200 Präparate als Extrakte aus Echinacea angustifolia deklariert sind [25,26]. Die restlichen rund 50 Arzneimittel beinhalten Echinacea purpurea-Extrakte. Während bei E. angustifolia meist die Ganzdroge oder die Wurzel verwendet wird, kommen bei E. purpurea überwiegend die oberirdischen Teile zur Anwendung. In den meisten Fällen liegen dabei Kombinationspräparate mit anderen Pflanzenextrakten vor.

1.3. Verfälschungs- und Verwechslungsproblematik der Echinacea-Drogen

Erste Berichte über Verfälschungen von Echinacea-Drogen mit anderen Pflanzen stammen aus den USA. So machte LLOYD [27,28] anfang dieses Jahrhunderts auf Verfälschungen mit Lespedeza capitata, Eryngium aquaticum, Rudbeckia nitida und Helianthus lenticularis aufmerksam. Die Ursachen dieser Verfälschungen liegen in der zeitweilig starken Nachfrage nach Echinacea-Drogen.

In den letzten Jahren machte wiederholt FOSTER [12,29,30] auf Verfälschungen von Echinacea-Drogen, insbesondere von E. purpurea-Wurzeln durch Parthenium integrifolium aufmerksam. BAUER und Mitarb. [31,32] konnten schließlich durch Untersuchungen in unserem Arbeitskreis nachweisen, daß der größte Teil der amerikanischen Importware von E. purpurea-Wurzeln auf dem europäischen Drogenmarkt mit Parthenium integrifolium verfälscht ist. Da der Habitus der beiden Pflanzen gänzlich verschieden ist und lediglich die pulverisierten Wurzeln eine gewisse Ähnlichkeit mit Echinacea-Arten aufweisen, ist anzunehmen, daß diese Verfälschung bewußt zur Erhöhung der Droгенаusbeute erfolgt, zumal die Wurzeln von Parthenium etwa fünfmal soviel wiegen wie die von E. purpurea. Möglichkeiten zur chemischen, morphologischen und anatomischen Unterscheidung der beiden Wurzeldrogen geben BAUER, HEUBL und KHAN [8,31,32,33].

SCHINDLER [34] und NEUGEBAUER [35] wiesen bereits früh auf eine mögliche Verwechslung von Echinacea angustifolia DC. mit Echinacea pallida (NUTT.) NUTT. hin. Die Unterscheidung dieser beiden Species, die von SCHINDLER [34] 1940 und MCGREGOR [5] 1968 eindeutig als unterschiedliche Arten klassifiziert wurden, ist in der Vergangenheit häufig vernachlässigt worden. So stellte sich bei Untersuchungen von BAUER und Mitarb. [32,33] heraus, daß in Europa sehr häufig unter der Bezeichnung "Echinacea angustifolia" Echinacea pallida kultiviert wird.

Auch die amerikanische Wurzel-Handelsware ist von dieser Verwechslung betroffen. Infolgedessen besteht ein Großteil der "Echinacea angustifolia"-Handelsdroge des europäischen Marktes sowie die daraus hergestellten Arzneipräparate aus *Echinacea pallida*.

Die Gründe für die bestehenden Verwechslungen bzw. die ungenügende Differenzierung der beiden Arten sind vielfältiger als die oben geschilderte Verfälschungproblematik bei *Parthenium integrifolium*. Da die taxonomische Einteilung der beiden Pflanzen lange Zeit strittig war, sind sie zum einen unter verschiedenen Bezeichnungen bekannt, zum anderen werden sie von Autoren teilweise als unterschiedliche Arten [34], als Varietäten [7] ("E. pallida var. angustifolia CRONQUIST") oder als gleichwertig eingestuft [36]. Dies führte zu großer Verwirrung, sodaß in Veröffentlichungen und Lehrbüchern mitunter falsche Abbildungen gezeigt werden und oft nicht mehr nachvollzogen werden kann, mit welcher Droge überhaupt gearbeitet wurde. So berichtet z.B. SCHINDLER [37] über *Echinacea angustifolia* DC., zeigt jedoch Abbildungen von *Echinacea angustifolia* HOOK. (= *Echinacea pallida* (NUTT.) NUTT.).

Möglichkeiten der chemischen, morphologischen und anatomischen Unterscheidung der beiden Arten geben BAUER, HEUBL und KHAN [8,32,33,38]. Sie sind auch ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit.

1.4. Beschreibung und Charakterisierung bisher bekannter Inhaltsstoffe

Während aus *Echinacea angustifolia* und *Echinacea purpurea* in der Vergangenheit zahlreiche Verbindungen isoliert wurden, war über die Inhaltsstoffe von *Echinacea pallida* lange Zeit nur sehr wenig bekannt. Erst durch neuere Untersuchungen in unserem Arbeitskreis [33,38,39,70] wurde auch diese Pflanze phytochemisch untersucht. Im folgenden soll eine Übersicht und Charakterisierung der bisher aus *Echinacea*-Pflanzen isolierten Verbindungen gegeben werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß aufgrund der zuvor geschilderten Verwechslungsproblematik vermutlich ein Teil der Arbeiten über E. angustifolia mit E. pallida durchgeführt wurde.

1.4.1. Alkylamide

Alkylamide sind eine im gesamten Pflanzenreich relativ selten vorkommende Naturstoffklasse. Lediglich in den Familien der Piperaceen, Rutaceen, Aristolochiaceen und vor allem in den Asteraceen sind sie häufiger anzutreffen. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind etwa 150 Vertreter dieser Inhaltsstoffklasse isoliert worden.

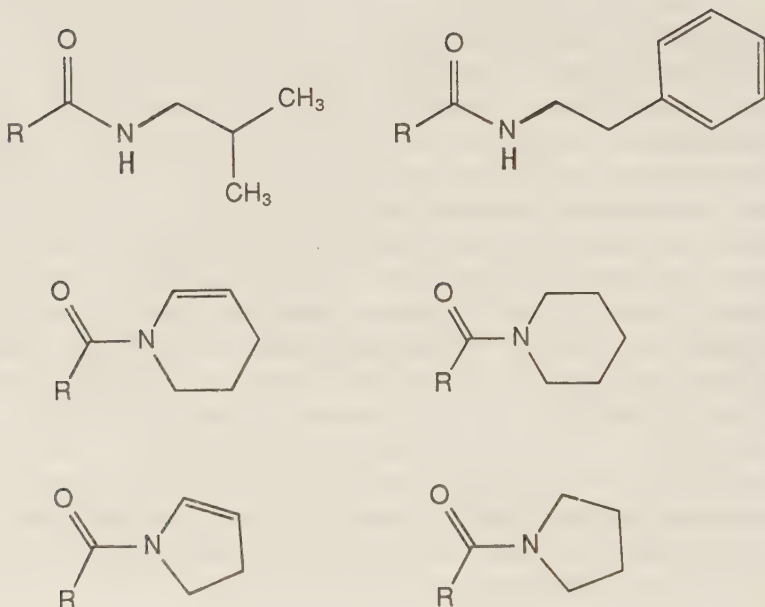
Der Säureanteil leitet sich biosynthetisch von der Ölsäure ab, während die Amingruppen aus den entsprechenden Aminosäuren entstehen. Diese werden nach der Anlagerung an die Carbonylgruppe der Fettsäure decarboxyliert und zum Teil cyclisiert, dehydriert oder hydroxyliert. Bis heute sind etwa 15 verschiedene Amingruppierungen bekannt, unter denen der Isobutylaminrest weitaus am häufigsten anzutreffen ist. Daneben ist die 2-Phenylethylamingruppe relativ stark vertreten. Piperidin-, Piperidein-, Pyrrolidin- und Pyrrolideinreste kommen fast ausschließlich in der Gattung *Achillea* vor und sind dort stark verbreitet [40,41,42]. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Aminanteile in Alkylamiden. Der Säurerest, der einer weitaus stärkeren Variation unterworfen ist, besteht aus einer langkettigen Fettsäure (9-18 C-Atome), die meist mehrere ungesättigte Zentren enthält. Während in den Alkylamiden aus den Familien der Piperaceen, Rutaceen und Aristolochiaceen ausschließlich olefinische Doppelbindungen im Säureanteil vorkommen, weisen die Amide der Asteraceen-Drogen häufig zusätzlich acetylenische Bindungen auf. Eine Übersicht über diese Stoffklasse gab kürzlich GREGER [43].

Über das Vorkommen von Alkylamiden in Echinacea-Arten wurde erstmals 1954 von JACOBSON [44] berichtet. Jedoch erst 1967 [45] konnte er das Echinacein als Dodeca-2E,6Z,8E,10E-tetraensäure-isobutylamid aus den Wurzeln von *E. angustifolia* und in geringer Menge auch aus *E. pallida* isolieren und identifizieren.

BOHLMANN und Mitarb. [46] isolierten etwa zur gleichen Zeit aus den Wurzeln von *E. angustifolia* und *E. purpurea* neben zwei Isobutylamiden vom Dien-dien-Typ ein Isomerengemisch eines Dodecatetraensäure-isobutylamides, das jedoch stereochemisch nicht genau definiert werden konnte.

Drei weitere Isobutylamide sowie ein 2-Methylbutylamid und ein 2-Hydroxyisobutylamid aus dem Kraut von *E. purpurea* wurden 1983 beschrieben [47].

Abb.4 : Überblick über die wichtigsten Aminogruppierungen in natürlich vorkommenden Alkylamiden



1.4.2. Polyacetylene (Polyine) und Polyene

Das Vorkommen von Polyacetylenen und Polyenen ist für Asteraceen-Drogen charakteristisch. Die überwiegende Anzahl der bisher isolierten Vertreter dieser polyungesättigten Naturstoffklasse stammt aus dieser Pflanzenfamilie. Die große Strukturvielfalt der oft sehr instabilen Verbindungen läßt sich aufgrund der theoretisch möglichen Kombinationen an Doppel- und Dreifachbindungen bereits erahnen. Tatsächlich sind in der Natur bereits die unterschiedlichsten Substitutionsmuster aufgefunden worden. Eine Übersicht über diese Thematik geben BOHLMANN, BURCKHARDT und ZDERO [48].

SCHULTE und Mitarb. [49] berichteten 1967 über Polyacetylene in der Gattung Echinacea. Hauptsächlich aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* isolierten sie 13 Polyacetylen-Verbindungen, wovon sie fünf strukturell aufklären konnten. Daneben fanden sie ein ungesättigtes Keton, 8Z-Pentadecen-2-on, welches in *E. angustifolia*-Wurzeln vorherrscht.

Über das Vorkommen von Z-1,8-Pentadecadien und Echinolon, einem ungesättigten Hydroxyketon, wurde von JACOBSON [50,51] in den Wurzeln von *E. angustifolia* berichtet.

In unserem Arbeitskreis konnten in neueren Untersuchungen von BAUER und KHAN [38,39] aus den Wurzeln von *E. pallida* 12 Ketoalkine und Ketoalkene isoliert und strukturell aufgeklärt werden.

1.4.3. · Kaffeesäurederivate

Der erste Vertreter aus der Stoffklasse der Kaffeesäurederivate in Echinacea-Arten wurde von STOLL und Mitarb. [52] 1950 gefunden. Sie konnten aus den Wurzeln von *E. angustifolia* einen Ester aus Kaffeesäure, Brenzkatechinethanol, Rhamnose und 2 Mol Glucose isolieren, den sie Echinacosid nannten. Die genaue Struktur wurde jedoch erst später ermittelt [53].

Cichoriensäure, ein Diester der Weinsäure mit 2 Mol Kaffeesäure, wurde 1984 von HSIEH [54,55] in allen Pflanzenteilen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* identifiziert. Daneben fand er den Monomethylester, sowie die entsprechenden Mono- und Diferuloylderivate der Cichoriensäure. Später wurden von SOICKE und Mitarb. [56] weitere Kaffeesäurederivate dieses Strukturtyps aus dem Kraut von *E. purpurea* isoliert.

In einer nach Abschluß unserer experimentellen Arbeiten erschienenen Publikation fanden CHEMINAT und Mitarb. [57] in *E. pallida* weitere Caffeoyleinsäurederivate sowie Caffeoyleglykoside vom Echinacosid-Typ.

1.4.4. Flavonoide

Nach Untersuchungen von MALONGA-MAKOSI [58] können weder *E. purpurea* noch *E. angustifolia* mit einem Gesamtgehalt an Flavonoiden von nur 0,48 % bzw. 0,38 % zu den flavonoidreichen Drogen gezählt werden.

Aus *E. angustifolia* konnten bisher Luteolin, Kämpferol, Quercetin, Quercetagetin-7-glucosid, Luteolin-7-glucosid, Kämpferol-3-glucosid, Quercetin-3-arabinosid, Quercetin-3-galaktosid, Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-rutinosid, Rutin, Isorhamnetin-3-rutinosid sowie drei weitere Diglykoside isoliert werden [58].

In *E. purpurea* wurden Quercetin, Quercetin-7-glucosid, Quercetin-3-glucosid, Rutin, Quercetin-3-robinobiosid, Kämpferol-3-rutinosid, Quercetin-3-xylosylgalaktosid, weitere Diglykoside des Isorhamnetins sowie ein Kämpferol-3-monoglykosid aufgefunden [58].

1.4.5. Sonstige Inhaltsstoffklassen

Polysaccharide

Von PROKSCH und WAGNER [2,3,4] wurden zwei Polysaccharide mit immunstimulierenden Eigenschaften aus dem Kraut von *E. purpurea* isoliert, ein Heteroxyylan mit einem Molekulargewicht von 35.000 D und ein Arabinorhamnogalaktan mit einem mittleren Molekulargewicht von 450.000 D.

STUPPNER [59] wies in Gewebekulturen aus *E. purpurea*-Blättern ein saures Arabinogalaktan (MG 75.000 D) sowie drei weitere Xyloglucane (MG 10.000 D, 25.000 D und 55.000 D) nach.

Ätherisches Öl

Erste Untersuchungen über den ätherischen Ölgehalt in Echinacea-Arten wurden von NEUGEBAUER [35] vorgenommen.

HEINZER und Mitarb. [60] fanden kürzlich in den Wurzeln von *E. pallida* bis zu 1 % ätherisches Öl, während die Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* nur Spuren enthielten (< 0,1 %). Neben Verbindungen, die bereits früher in Echinacea beschrieben wurden, konnten die Autoren zusätzlich Vertreter aus der Stoffklasse der Alkenylisovalerate auffinden. Weiterhin wurden β -Caryophyllen, Caryophyllenepoxid und Humulen [61] als Inhaltsstoffe des ätherischen Öls aus Echinacea-Drogen iden-

tifiziert.

Pyrrolizidinalkaloide

Die Pyrrolizidinalkaloide Tussilagin und Isotussilagin wurden von RÖDER und Mitarb. [62] in sehr geringer Konzentration (ca. 0,006%) in *E. purpurea* und *E. angustifolia* nachgewiesen. Eine toxische Wirkung dieser Alkaloide kann jedoch nach der Struktur-Wirkungsbeziehung nach MATTOCKS [63] ausgeschlossen werden.

Als weitere Verbindungen aus *Echinacea* konnten Inulin, Pentosane, reduzierende Zucker [64], Ölsäure, Linolsäure, Cerotinsäure, Palmitinsäure [65], Ascorbinsäure [66], Vanillin, Germacren D, 4-Hydroxyzimtsäuremethylester, eine Hydroxytriensäure sowie ein Labdanderivat [47] identifiziert werden.

1.5. Bisheriger Stand der Analytik

Der erste Versuch einer Abgrenzung von *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* wurde von SCHINDLER [34,37] im Zuge einer Überarbeitung des Homöopathischen Arzneibuchs unternommen. Er charakterisierte die drei Arten vor allem durch morphologische Unterschiede und physikalisch-chemische Eigenschaften der Tinkturen. Für die Tinktur aus *E. angustifolia*-Wurzeln beschrieb er außerdem das Kapillarbild und das Papierchromatogramm.

HEUBL, BAUER und WAGNER [8] berichteten kürzlich über morphologische und anatomische Studien an *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia*, *E. pallida* und *Parthenium integrifolium*. Dabei wurden einerseits Kriterien einer Unterscheidung der drei *Echinacea*-Arten untereinander erstellt und andererseits die Verfälschung *Parthenium integrifolium* abgegrenzt.

Das ätherische Öl der drei *Echinacea*-Arten war Gegenstand einer Untersuchung durch HEINZER und Mitarb. [60]. Obwohl in *E. angustifolia* und *E. purpurea* nur Spuren davon enthalten sind, wurden Unterschiede im Inhaltsstoffmuster der drei Öle angegeben.

Von verschiedenen Autoren [67,68,69] wurden HPLC- und DC-Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Echinacosid vorgeschlagen.

Von unserem Arbeitskreis wurden bereits mehrere Arbeiten veröffentlicht, die verschiedene Aspekte zur Analytik von Echinacea-Drogen berücksichtigen [8,32, 33,38,70,71,72].

Während *Echinacea angustifolia* bereits seit 1934 mit einer Monographie im Homöopathischen Arzneibuch enthalten ist, wurde *Echinacea purpurea* erst 1985 aufgenommen. Dabei wird von *E. angustifolia* die frische Ganzpflanze, von *E. purpurea* nur die frischen oberirdischen Teile verwendet. Neu aufgenommen in das DAB 9 wurde eine Monographie der Wurzeln von *Echinacea angustifolia*. Auf die Analytik der einzelnen Arzneibuchvorschriften wird im Kapitel 5 näher eingegangen.

2. Isolierung und Identifizierung phenolischer Verbindungen aus *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia*

Da rückwirkend die Identität des bei früheren Untersuchungen verwendeten Drogenmaterials als zweifelhaft beurteilt werden muß, sollten die hydrophilen Inhaltsstoffe authentischen Drogenmaterials von *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia* einer nochmaligen Überprüfung unterzogen werden. Dazu sollten die Hauptinhaltsstoffe der hydrophilen Fraktionen der beiden Arten identifiziert und gegebenenfalls für pharmakologische Testungen isoliert werden.

2.1. Voruntersuchungen

Für die Voruntersuchungen wurden jeweils aus den Wurzeln und den oberirdischen Teilen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* Methanol-Gesamtextrakte durch Soxhlet-Extraktion hergestellt.

2.1.1. Dünnschichtchromatographie

Bei der Suche nach einem geeigneten DC-Laufmittel für die Methanolextrakte zeigte sich, daß ein Säurezusatz zur mobilen Phase für eine scharfe Abgrenzung der Zonen unbedingt notwendig war. Dieses Verhalten sprach für einen phenolischen oder sauren Charakter der hydrophilen Komponenten. Nach der Erprobung verschiedener Laufmittel-Kombinationen für die DC erwies sich das polare Fließmittel Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure-Wasser (5:100:10:10) für die Auftrennung der einzelnen Zonen als am besten geeignet (Abb.5).

Neben der Färbung im VIS und im UV wurden die Zonen durch mehrere Detektionsmittel charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgelistet.

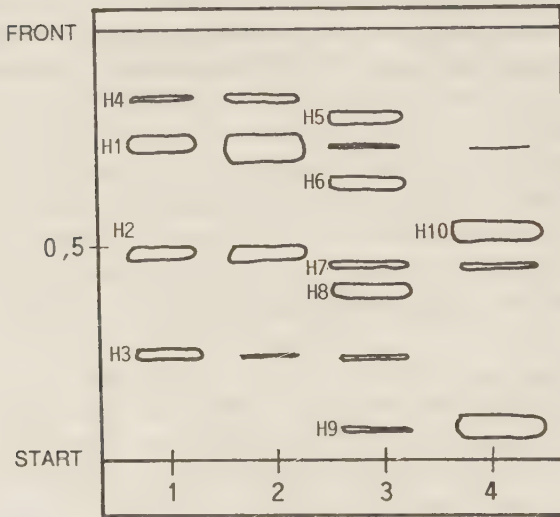
Durch Detektion mit Naturstoffreagenz/PEG wurden neben einer Verstärkung der Eigenfluoreszenzen der Banden auch charakteristische Farbabstufungen erzielt, sodaß dieses Reagenz zur Detektion der hydrophilen Echinacea-Inhaltsstoffe besonders geeignet war.

Zwischen den Dünnschichtchromatogrammen der Methanolextrakte aus *E. purpureae* herba und -radix konnten keine qualitativen Unterschiede festgestellt werden. Neben einer Hauptzone im oberen Rf-Bereich (Rf 0.75) war eine weitere Bande im mittleren Rf-Bereich sichtbar. Beide Zonen zeigten nach Detektion mit Naturstoff/PEG eine starke gelbgrüne Fluoreszenz im langwelligen UV-Licht.

Im Gegensatz dazu waren die DC-Bilder der ober- und unterirdischen Teile von *E. angustifolia* unterschiedlich. Im Extrakt von *E. ang. radix* war eine blaugrün fluoreszierende Hauptzone im unteren Rf-Bereich neben einer zweiten stärkeren Bande im mittleren Rf-Bereich erkennbar. Die untere Zone war im Extrakt der oberirdischen Teile von *E. angustifolia* nur sehr schwach sichtbar, während andere deutliche Banden über die gesamte Trennstrecke verteilt waren.

Das Detektionsverhalten der Zonen zeigte eindeutig, daß es sich bei allen Hauptkomponenten um phenolische Verbindungen und/oder Carbonsäuren handeln mußte.

Abb.5 : Dünnschichtchromatogramm der Methanol-Extrakte der Wurzeln und des Krautes von *E. purpurea* und *E. angustifolia*



Zuordnung:

- 1: *E. purp.* herba
- 2: *E. purp.* radix
- 3: *E. ang.* herba
- 4: *E. ang.* radix

LM: Toluol-Ethyl-
formiat-HCOOH-
Wasser
(5:100:10:10)
= DC-T1

Tab.2 : Detektionsverhalten der DC-Zonen H1-10

Zone	vis	Fluoresz. Minderung UV 254 nm	UV 366	NST/PEG UV 366	Anisald. /H ₂ SO ₄ vis	NH ₃ vis	FeCl ₃ 10 % vis
H1	gelb	+	blau	gelbgrün	violett	gelb	alle
H2	----	+	blau	gelbgrün	violett	gelb	Zonen
H3	rot	+	rötlich	orange	orange	gelb	zeigen
H4	----	+	blau	gelbgrün	violett	gelb	grün-
H5	----	+	blau	blau	violett	gelb	schwarze
H6	----	+	blau	blau	violett	gelb	Färbun-
H7	----	+	blau	blau	violett	gelb	gen
H8	----	+	blau	blaugrün	braun	gelb	
H9	gelb	+	blau	blaugrün	schwarz	gelb	
H10	----	+	blau	blau	violett	gelb	

2.1.2. Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die analytische HPLC entwickelten wir ein Umkehrphasen-Trennsystem mit RP18-Material und Acetonitril/Wasser-Gemischen mit Phosphorsäurezusatz als Eluens. Ein Gradientensystem von 5-25 % Acetonitril in 20 Minuten (=HPLC-T1) lieferte eine gute Auftrennung der enthaltenen Substanzen. Die so erhaltenen HPLC-Chromatogramme bestätigten, daß bei *E. purpurea* die hydrophilen Inhaltsstoffe aus dem Kraut und den Wurzeln qualitativ gleich sind, während bei *E. angustifolia* Unterschiede auftreten.

Die Verwendung eines Diodenarray-Detektors gestattete neben der schnellen Ermittlung der optimalen Detektionswellenlänge (330 nm) die Aufnahme der UV-Spektren der detektierten Substanzen, welche ein wesentliches Hilfsmittel zur Peak-Identifizierung darstellen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, strukturell ähnliche Verbindungen auf diese Art und Weise schnell zu erkennen. Eine Erläuterung der Methode der Diodenarray-Detektion geben ELGASS und Mitarb. [73].

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen die HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte der ober- und unterirdischen Teile von *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia*.

2.2. Isolierung der Verbindungen H1 und H2

Die beiden Hauptzonen der Methanolextrakte von *Echinacea purpurea* konnten zunächst nicht durch Referenzsubstanzen zugeordnet werden und mußten daher zur Identifizierung und für pharmakologische Testungen isoliert werden. Als Ausgangsmaterial wählten wir die Wurzeln, da beide Substanzen laut DC darin in hoher Konzentration enthalten waren.

Erste Isolierungsversuche ließen erkennen, daß für eine gute chromatographische Trennleistung auch hier ein Säurezusatz zur mobilen Phase unerläßlich war. Im weiteren Isolierungsgang führte der Säurezusatz jedoch dazu, daß mit zunehmender Konzentration des Ansatzes die Substanzen abgebaut wurden, was offensichtlich durch ihre Hydrolyseempfindlichkeit bedingt war. Da alle literaturbekannten Methoden zur Entfernung der Säure nicht zum Erfolg führten, wurde eine Isolierungsmethode entwickelt, die nur einen sehr geringen Säurezusatz erforderte und eine rasche und schonende Abtrennung der Säure ermöglichte.

Abb.6 : HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte aus den oberirdischen Teilen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* (Trennsystem HPLC-T1)

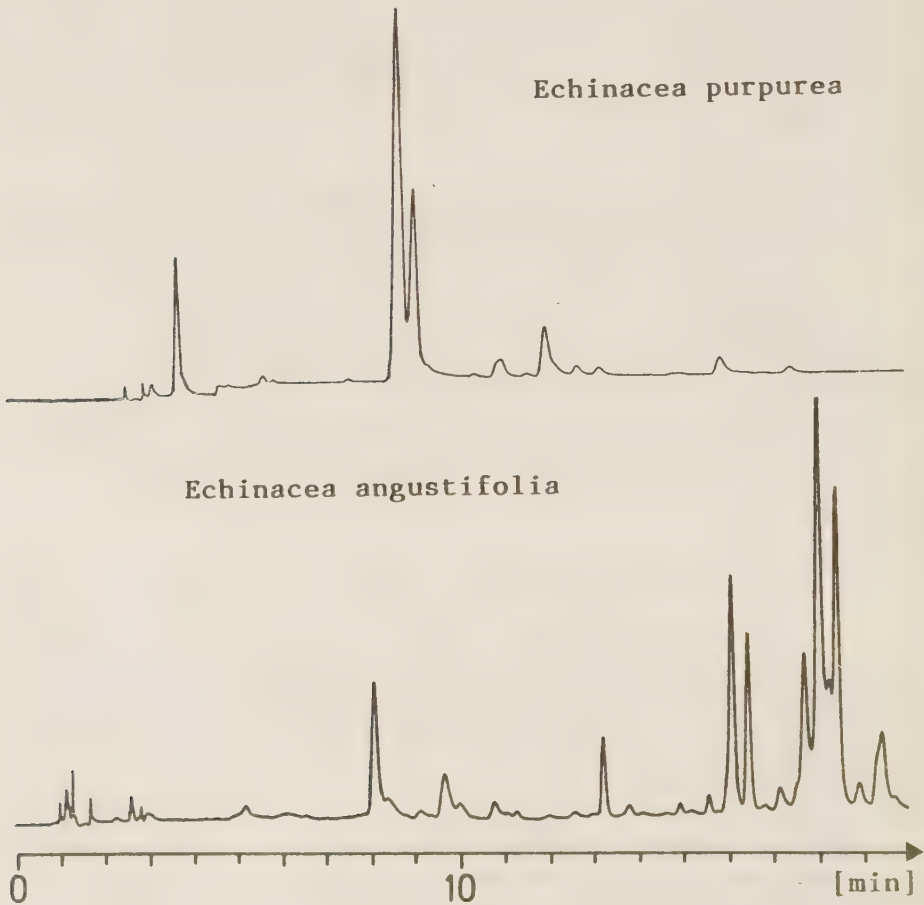
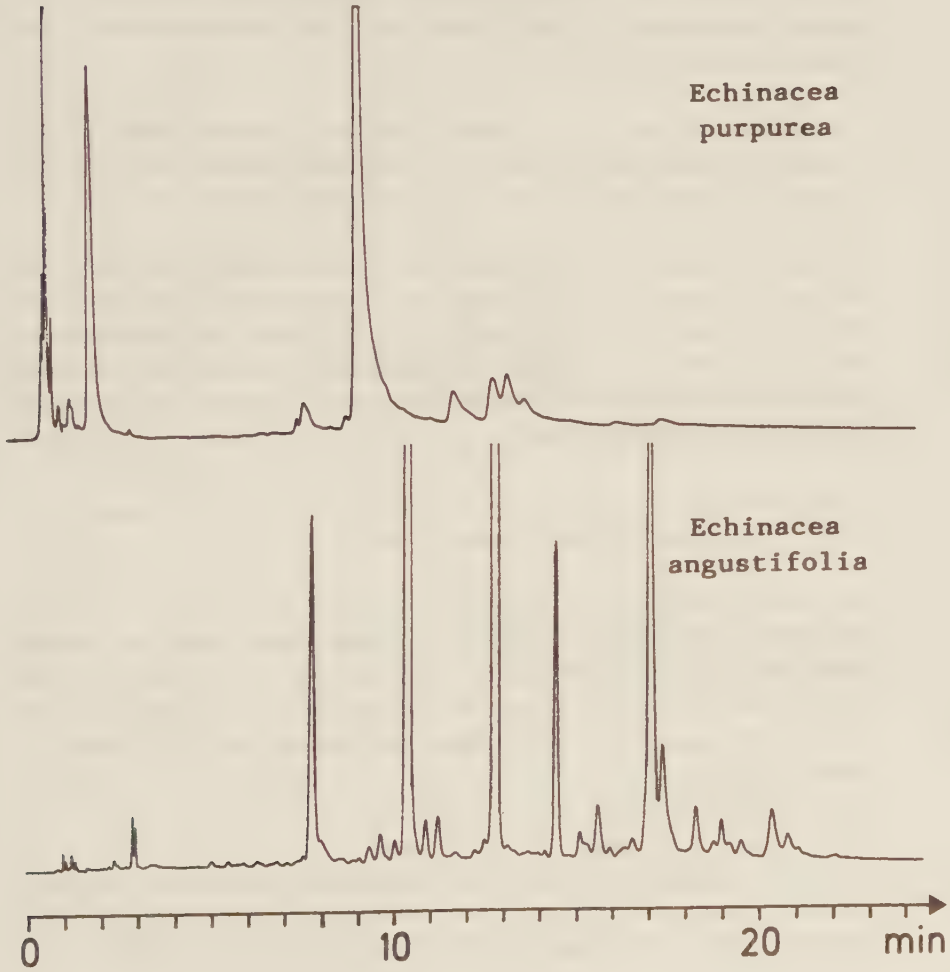


Abb.7 : HPLC-Chromatogramme der Methanolextrakte aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* (Trennsystem HPLC-T1)



2.2.1. Extraktion und Anreicherung

Die pulverisierten Wurzeln von *E. purpurea* wurden zunächst zur Entfernung von lipophilen Bestandteilen mit n-Hexan in einer Soxhlet-Apparatur erschöpfend extrahiert, da entsprechende Voruntersuchungen gezeigt hatten, daß die hydrophilen phenolischen Inhaltsstoffe in n-Hexan unlöslich waren. Der Hexanextrakt wurde später zur Isolierung der lipophilen Alkylamide verwendet.

Anschließend extrahierten wir die Droge mit Methanol, wobei die polaren bis mitelpolaren Inhaltsstoffe gelöst wurden. Aus 1,8 kg Droge wurden so nach dem Abdampfen des Lösungsmittels 337 g brauner, zähflüssiger Extrakt gewonnen.

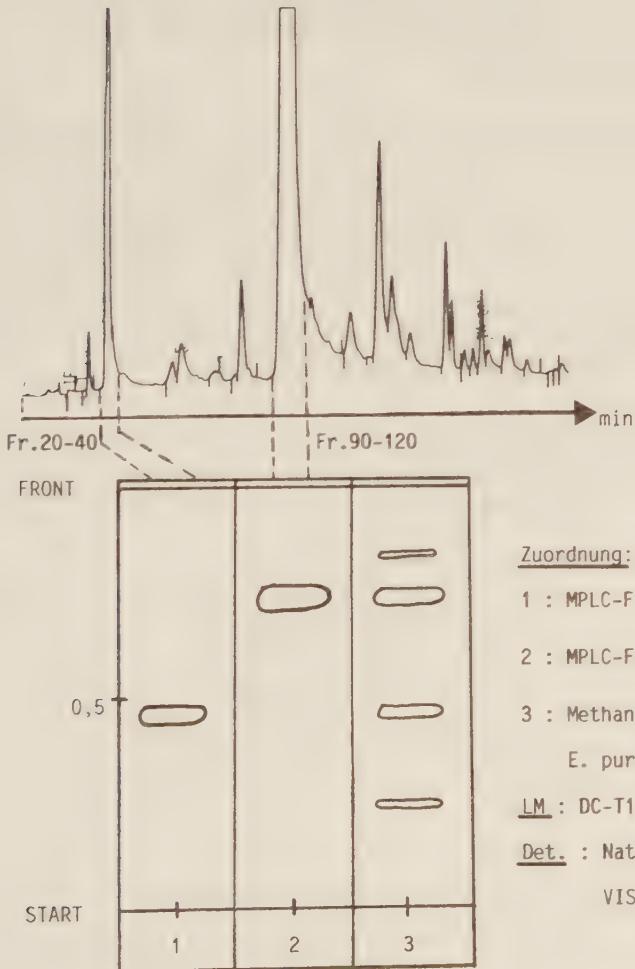
Zur Anreicherung der phenolischen Substanzen wurde der Extrakt in MeOH 50 % gelöst und mit Salzsäure auf pH 3 angesäuert. Die dadurch undissoziiert vorliegenden Phenole und Carbonsäuren konnten daraufhin mit Ethylacetat ausgeschüttelt werden. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel abgedampft. Der verbleibende braune Rückstand (152 g) enthielt die phenolischen Inhaltsstoffe in stark angereicherter Form.

2.2.2. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Die weitere Auftrennung der angereicherten Fraktion erfolgte mit Hilfe der Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC). Als stationäre Phase wählten wir reversed-phase Material (RP-8). Als Elutionsmittel diente zunächst Acetonitril-Wasser 10 : 90. Nach 40 Minuten wurde der Anteil an Acetonitril auf 15 % erhöht. Dem Elutionsmittel war jeweils 1 % 0.1 N Phosphorsäure zugesetzt. Die gesammelten Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch im Trennsystem DC-T1 untersucht und gleiche Fraktionen vereinigt.

Abbildung 8 zeigt das Elutionsprofil der angereicherten Phenolfraktion der MPLC sowie die zugeordneten DC-Zonen. Die Fraktionen 20-40 und 90-120 enthielten chromatographisch reine Substanzen, welche den Zonen H2 und H1 in der DC zugeordnet werden konnten.

Abb.8 : MPLC-Elutionsprofil der angereicherten Phenolfraktion und DC-Zuordnung der MPLC-Fractionen



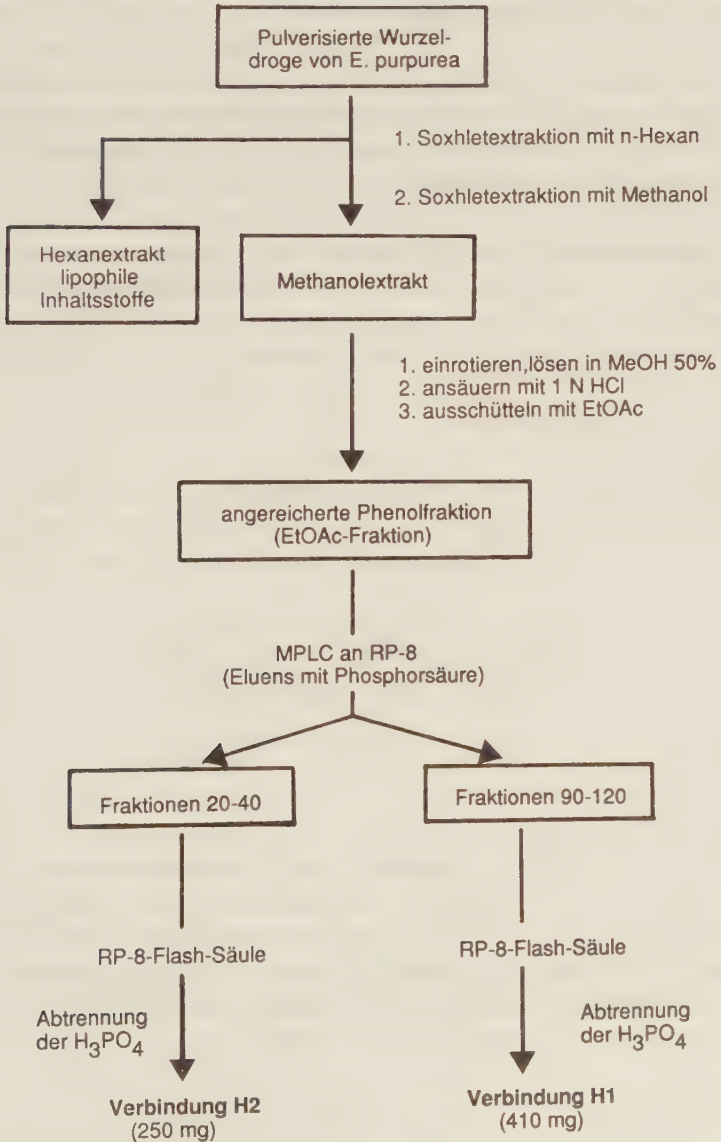
2.2.3. Abtrennung der Phosphorsäure aus dem Isolierungsansatz

Die beiden MPLC-Fractionen wurden anschließend jeweils schonend am Rotationsverdampfer vom Acetonitril befreit. Die verbleibenden wäßrig-phosphorsauren Lösungen wurden dann auf eine kleine Säule gegeben, die mit RP-8-Material gepackt und mit Wasser äquilibriert war. Durch Anlegen eines schwachen Überdruckes (Flash-Chromatographie) wurde nun jeweils die gesamte wäßrige Fraktion auf die Säule aufgegeben und mit Wasser eluiert.

Da Wasser auf reversed-phase-Material nur eine sehr schwache Elutionskraft besitzt, blieben die Phenole am Anfang der Säule haften, während die hydrophilere Phosphorsäure mit der Lösungsmittelfront eluiert wurde. Durch pH-Wertkontrolle des aus der Säule kommenden Laufmittels konnte die vollständige Abtrennung der Phosphorsäure überprüft werden. Als der pH-Wert wieder im neutralen Bereich war, wurden die Phenole mit Acetonitril 50 % von der Säule gespült und aufgefangen. Anschließend wurde der Acetonitril-Anteil schonend abrotiert und die wäßrigen Lösungen der Verbindungen H1 und H2 jeweils gefriergetrocknet.

Durch diese Methode konnten von Verbindung H1 410 mg, von Verbindung H2 250 mg Reinsubstanz gewonnen werden.

Abb.9 : Schematischer Isolierungsgang der Verbindungen H1 und H2 aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea*



2.3. Identifizierung und Strukturaufklärung

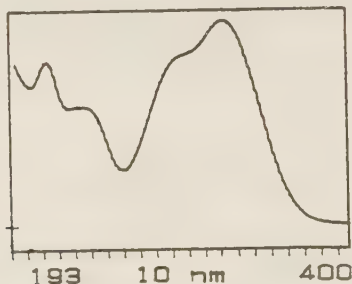
2.3.1. Verbindung H1: Cichoriensäure

2.3.1.1. UV- und IR-Spektroskopie

Das während der HPLC-Trennung online aufgenommene UV-Spektrum von Verbindung H1 (Abb.10) zeigte ein Absorptionsmaximum bei 325 nm und eine Inflexion bei 300 nm. Es war annähernd identisch mit dem UV-Spektrum der Kaffeesäure, so daß die chromophore Gruppe der Verbindung ein Caffeoylrest sein mußte.

Im IR-Spektrum waren neben einer ausgeprägten OH-Bande bei 3400 cm^{-1} Carbonylbanden bei 1725 und 1700 cm^{-1} zu sehen. Außerdem zeigten Banden bei 1600 und 1515 cm^{-1} das Vorhandensein eines aromatischen Systems an. Somit unterstützte das IR-Spektrum das Vorliegen eines Kaffeesäurederivates.

Abb.10 : UV-Spektrum von Verbindung H1



Kaffeesäurederivate sind bereits früher aus Echinacea-Arten isoliert worden [54, 55]. Ein Vergleich von Verbindung H1 mit Referenzsubstanzen zeigte, daß das chromatographische Verhalten mit Cichoriensäure identisch war, einem Diester der Weinsäure mit zwei Mol Kaffeesäure. Zur Absicherung der Identität von Verbindung H1 mit Cichoriensäure wurden jedoch noch weitere spektroskopische Untersuchungen unternommen.

2.3.1.2. FAB-Massenspektroskopie

Zunächst versuchten wir ein Massenspektrum von Verbindung H1 durch Elektronenstoßionisation (EI) und chemische Ionisation (CI) aufzunehmen. Es konnte dabei jedoch kein reproduzierbares Molekülion erhalten werden, da die Substanz sich offensichtlich noch vor der Ionisation zersetzte.

Wir wandten daher die Fast-Atom-Bombardement-Massenspektroskopie (FAB-MS) an, die bei Negativionendetektion ein Pseudomolekülion bei m/z 473 ($[M-H]^-$) lieferte. Die Hochauflösung ergab für $[M-H]^-$ eine Masse von 473,07205 mit der zugehörigen Summenformel $C_{22}H_{17}O_{12}$ (ber. 473,07202). Das heißt, daß Verbindung H1 ein Molekulargewicht von 474 mit der Summenformel $C_{22}H_{18}O_{12}$ besitzt. Diese Daten stimmten exakt mit denen der Cichoriensäure überein.

2.3.1.3. 1H -NMR-Spektroskopie

Auch im 1H -NMR-Spektrum von Verbindung H1 konnte das Vorliegen von Cichoriensäure bestätigt werden. Im 80 MHz-Spektrum (Abb.12) waren lediglich im Bereich von 5.75 bis 7.70 ppm Signale vorhanden. Dem Kaffeesäureanteil konnten dabei eindeutig die Signale von 6.2 bis 7.7 ppm zugeordnet werden:

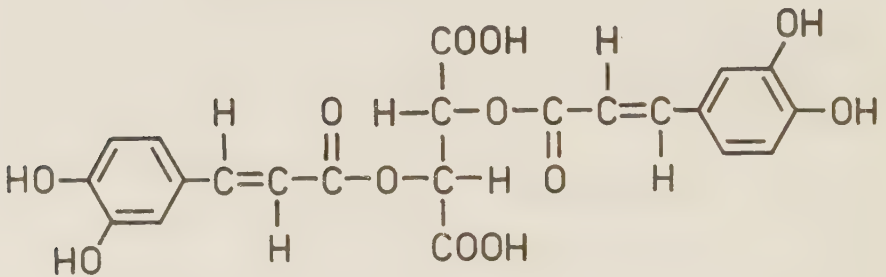
Drei aromatische Protonen (6.82 ppm, d, 2H, $J = 8$ Hz, H-5'; 7.10 ppm, d, 2H, $J = 8$ Hz, H-6'; 7.17 ppm, s, 2H, H-2') sowie zwei olefinische Protonen (6.43 ppm, d, 2H, AB-System A-Teil, $J = 15$ Hz, H- α ; 7.60 ppm, d, 2H, AB-System B-Teil, $J = 15$ Hz, H- β).

Aufgrund der Kopplungskonstante des AB-Systems von 15 Hz konnte den Doppelbindungen eine trans-Konfiguration zugeordnet werden. Die Protonen der Hydroxylgruppen wurden durch Zugabe von deuterierter Trifluoressigsäure ausgetauscht.

Das Singulett bei 5.75 ppm stammte von den beiden Protonen an C-2 und C-3 der Weinsäure. Da das Molekül zwei magnetisch identische Molekülhälften besitzt, waren die NMR-Signale der beiden Hälften kongruent, wobei das Integrationsverhältnis der Kaffeesäureprotonen zu den restlichen Protonen des Moleküls 5:1 betrug.

Das vorliegende ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung H1 erwies sich als identisch mit den Literaturwerten der Cichoriensäure. Damit war die Struktur von Verbindung H1, der Hauptsubstanz der hydrophilen Fraktion aus *E. purpureae* herba und -radix als Cichoriensäure (2,3-Dicaffeoylweinsäure) gesichert.

Abb.11 : Cichoriensäure (Verbindung H1)



2.3.1.4. Stereochemie

Die Messung des Drehwinkels von Verbindung H1 ergab eine spezifische Drehung von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -368.6^\circ$ ($c = 0.3$; Methanol).

SCARPATI und ORIENTE [74], die Cichoriensäure erstmals aus *Cichorium intybus* isolierten, konnten zeigen, daß die enthaltene Weinsäure in der (2S,3S)-(-)-Form vorlag. Der entsprechende Ester zeigte jedoch die entgegengesetzte Drehrichtung ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +383.5^\circ$).

Aufgrund der genau umgekehrten Drehrichtung muß die Cichoriensäure aus *Echinacea purpurea* das Enantiomer zur Verbindung aus *Cichorium intybus* darstellen, d.h. daß in der Verbindung aus *Echinacea* die (+)-Weinsäure verestert ist, was auch SOICKE und Mitarb. [56] feststellten. Eine endgültige Aussage, ob es sich dabei um die (2S,3S)- oder (2R,3R)-Cichoriensäure handelt, kann jedoch aufgrund der vorliegenden Daten nicht gemacht werden.

Cichoriensäure wurde auch aus *Lactuca sativa* (Kopfsalat) [75] und *Cichorium endivia* (Endivien) [76] isoliert, wobei jeweils die rechtsdrehenden Stereoisomere vorlagen. HSIEH [55] fand Cichoriensäure erstmals in *Echinacea*-Arten, machte jedoch keine Angaben zur Stereochemie.

In den HPLC-Chromatogrammen der Extrakte aus *E. purpurea* ist kurz nach dem Peak der Cichoriensäure ein zweiter Peak sichtbar, der ein sehr ähnliches UV-Spektrum liefert. Dieser Peak konnte auch nachgewiesen werden, wenn die Reinsubstanz in Methanol gelöst und die Lösung einige Zeit stehen gelassen wurde. Nach längerer Zeit in Lösung stellte sich sogar ein 1:1-Gleichgewicht der beiden Peaks ein. Nach HERRMANN [77] ist dies durch eine cis-trans-Isomerisierung der Kaffeesäuredoppelbindungen in Lösung erklärbar, wodurch sich mehrere Stereoisomere bilden.

2.3.2. Verbindung H2: 2-Caffeoyl-weinsäure

2.3.2.1. UV- und IR-Spektroskopie

Das UV-Spektrum von Verbindung H2 mit Maxima bei 325 nm und 300 nm war identisch mit dem von H1 (Abb.10). Ebenso waren die IR-Spektren der beiden Substanzen fast deckungsgleich. Lediglich die Aromaten-Banden im Bereich von $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ waren bei Verbindung H2 etwas schwächer ausgeprägt.

Demzufolge sollte die Verbindung H2 eine enge strukturelle Verwandtschaft zu Cichoriensäure (H1) besitzen.

2.3.2.2. FAB-Massenspektroskopie

Die Aufnahme eines FAB-MS lieferte bei Detektion der negativen Ionen (Abb.14) ein Pseudomolekülion bei m/z 311 ($[M-H]^-$), bei Positivionendetektion (unter Zusatz von LiCl) ein Pseudomolekülion bei m/z 319 ($[M+Li]^+$), womit ein Molekulargewicht von 312 bewiesen war.

Die Differenz von 162 Masseneinheiten im Vergleich zu Cichoriensäure (MG 474) deutete auf das Fehlen eines Caffeoylrestes hin.

2.3.2.3. ^1H -NMR-Spektroskopie

Im 80 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung H2 (Abb.15) waren im Bereich von 6.20 bis 7.75 ppm die Protonensignale der Kaffeesäure zu sehen. Anstelle des Singuletts bei 5.75 ppm im Spektrum der Verbindung H1 erschienen nun jedoch zwei Doubletts bei 4.68 ppm und 5.43 ppm mit der Integration für je ein Proton und der Kopplungskonstante von je 2.2 Hz.

Dies ist dadurch zu erklären, daß nach Abspaltung eines Caffeoylrestes aus der 2,3-Dicaffeoylweinsäure die beiden Protonen in 2- und 3-Stellung der Weinsäure nicht mehr magnetisch äquivalent sind.

Die Struktur der Verbindung H2 konnte nach den spektroskopischen Ergebnissen eindeutig als 2-Caffeoyl-weinsäure (Abb.13) identifiziert werden.

Abb.13 : 2-Caffeoyl-weinsäure (Verbindung H2)

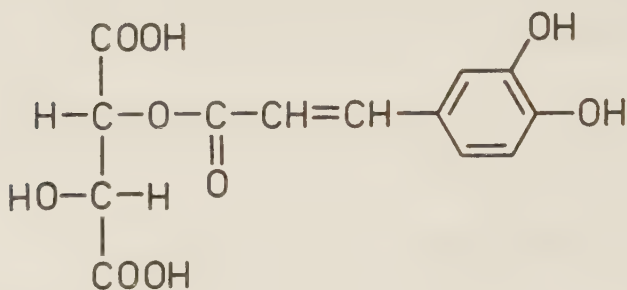


Abb.14 : FAB-MS (negative Ionen) von 2-Caffeoyl-weinsäure (Verb. H2)

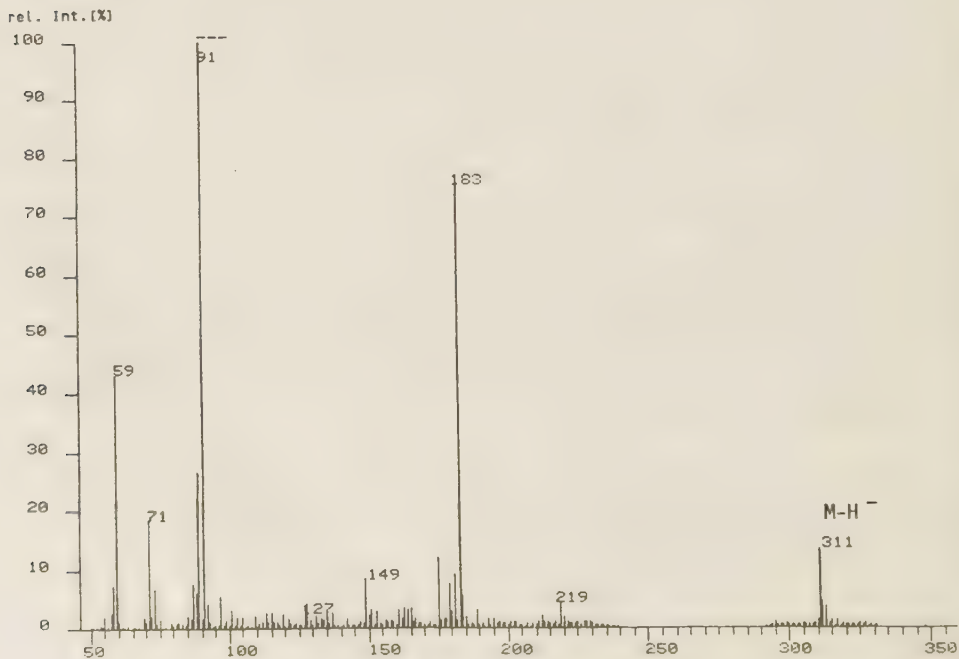
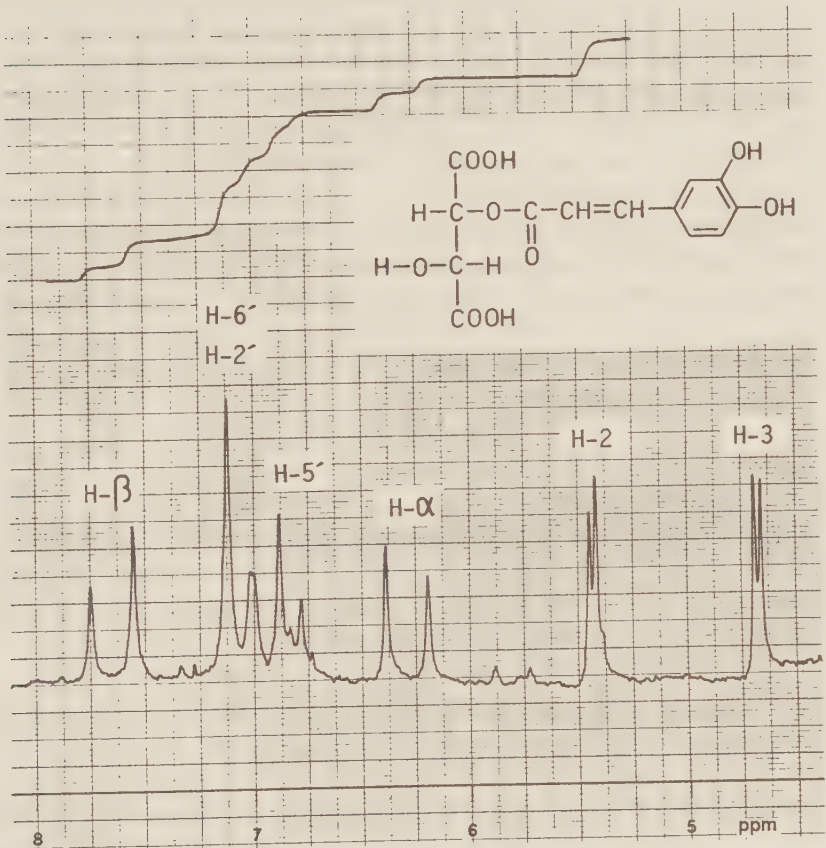


Abb.15 : 80 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von 2-Caffeoyl-weinsäure (Verb.H2)



2.3.2.4. Stereochemie

Die spezifische Drehung von Verbindung H2 wurde mit $[\alpha]_D^{20} = -21.4^\circ$ ($c= 0.2$; Methanol) bestimmt. In Analogie zur Cichoriensäure sollte also auch hier die (+)-Weinsäure als Ausgangsprodukt vorliegen. Eine definitive Aussage über die absolute Konfiguration der asymmetrischen Zentren an C-2 und C-3 kann jedoch ohne weitergehende Untersuchungen nicht gemacht werden.

Das Vorkommen dieser Verbindung in Echinacea-Arten war bis dahin noch nicht beschrieben worden. Nach Abschluß und Veröffentlichung unserer Untersuchungen [70] erschien ein Artikel von SOICKE und Mitarb. [56], die ebenfalls über das Vorkommen von 2-Caffeoyl-weinsäure in Echinacea purpurea berichteten.

SCARPATI und D'AMICO [78] isolierten 2-Caffeoyl-weinsäure erstmals aus Cichorium intybus, wobei diese Verbindung jedoch wiederum aufgrund des entgegengesetzten Drehwinkels das Enantiomer zu unserer Verbindung darstellt.

Die Substanz ist auch in den Beeren von Vitis-vinifera-Arten enthalten, wo sie unter dem Namen Caftarsäure bekannt ist [79,80].

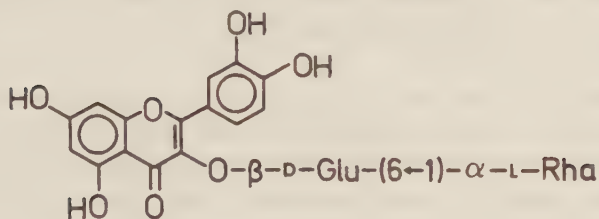
2.3.3. Verbindung H3: Rutin

Verbindung H3 war in den oberirdischen Teilen von Echinacea purpurea und E. angustifolia in mittlerer bis geringer Konzentration enthalten.

Das Detektionsverhalten mit Naturstoffreagenz/PEG (orangerote Fluoreszenz) wies bereits auf das Vorliegen eines Flavonoids vom Flavonol-Typ hin.

Durch Co-Chromatographie mit Referenzsubstanzen in verschiedenen DC- und HPLC-Trennsystemen sowie durch Vergleich des online aufgenommenen UV-Spektrums wurde Verbindung H3 als Rutin identifiziert (Abb.16).

Abb.16 : Rutin (Quercetin-3-O- β -D-rutinosid)



Diese Substanz wurde bereits früher von MALONGA-MAKOSI [58] aus Echinacea-Arten isoliert. Obwohl von ihm daneben noch eine Vielzahl weiterer Flavonoide in Echinacea beschrieben wurden, konnten wir durch DC und HPLC ohne besondere Anreicherungs-schritte keine zusätzlichen Verbindungen dieses Typs nachweisen. Offensichtlich liegen die anderen Flavonoide nur in Spuren im genuinen Extrakt vor.

2.3.4. Verbindung H4: Cichoriensäuremethylderivat

Bei Verbindung H4 handelt es sich aufgrund des Detektionsverhaltens, des chromatographischen Verhaltens und des UV-Spektrums wahrscheinlich um einen Methylester oder -ether der Cichoriensäure, welche kürzlich beschrieben wurden [55].

2.3.5. Verbindung H5, H6 und H7: Isochlorogensäuren und Chlorogensäure

Das Detektionsverhalten der Zonen H5, H6 und H7, die lediglich im Kraut von *E. angustifolia* (Verbindung H7 auch in geringer Menge in den Wurzeln) vorkamen, wich deutlich von dem der Caffeyol-weinsäureester ab. Die blau fluoreszierenden Zonen wurden durch präparative DC im Mikromaßstab isoliert. Sie konnten den HPLC-Peaks bei 8 min. (Verbindung H7) bzw. bei 17-19 min. (Verbindung H5 und H6) zugeordnet werden.

Die UV-Spektren (Abb.17) ließen wieder das Vorhandensein eines Caffeoylrestes erkennen. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen konnte Verbindung H7 eindeutig als Chlorogensäure (Abb.18) identifiziert werden, während es sich bei den Verbindungen H5 und H6 um Isochlorogensäuren handelt (Abb.18).

Nach HERRMANN [81] stellen die Isochlorogensäuren ein Gemisch mehrerer DicaFFEoyl-chinasäuren (3,4-, 3,5- und 4,5-Di-O-caffeoyl-D-chinasäure) dar, die durch Umesterung sehr leicht isomerisieren. Aus jeder einzelnen Verbindung kann so ein Gemisch der drei Isomeren entstehen, weshalb eine genaue Identifizierung der einzelnen Zonen bzw. Peaks nicht möglich ist.

Das Vorkommen von Chlorogensäure und Isochlorogensäuren in Echinacea-Arten war bisher noch nicht beschrieben worden. Nach Abschluß und Publikation unserer Arbeiten veröffentlichte auch CHEMINAT und Mitarb. [57] entsprechende Ergebnisse.

Abb.17 : UV-Spektrum der Verbindungen H5, H6 und H7

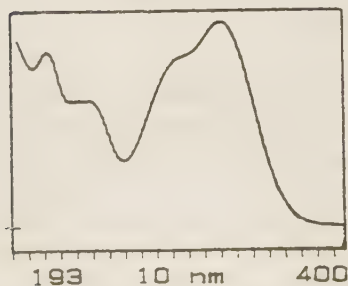
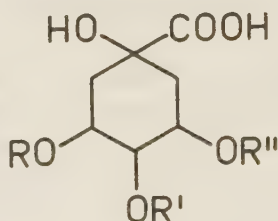


Abb.18 : Chlorogensäure und Isochlorogensäuren



H7: 3-O-Caffeoyl-chinasäure
(Chlorogensäure)

$R' = R'' = H$; $R = \text{-caffeoyl}$;

Isochlorogensäuren

H5, H6: $R'' = H$; $R = R' = \text{-caffeoyl}$;

$R' = H$; $R = R'' = \text{-caffeoyl}$;

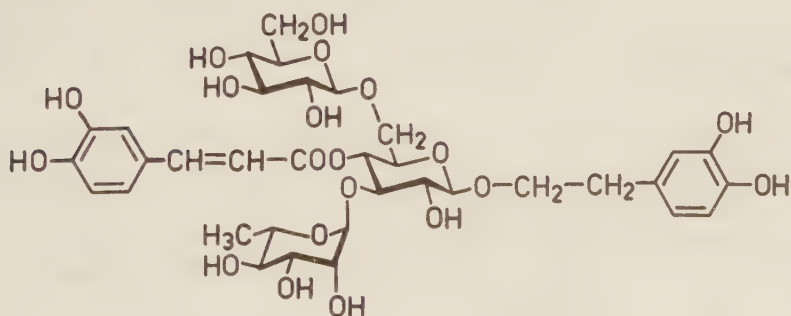
$R = H$; $R' = R'' = \text{-caffeoyl}$;

2.3.6. Verbindung H9: Echinacosid

Die Hauptverbindung aus den Wurzeln von *E. angustifolia* konnte mittels Referenzsubstanz als das von STOLL und Mitarb. [52] isolierte Echinacosid identifiziert werden.

Echinacosid ist ein Glykosid, das aus Kaffeesäure, Brenzkatechinethanol, ein Mol Rhamnose sowie zwei Mol Glucose aufgebaut ist (Abb.19). Nach BECKER [82] liegt Echinacosid in Lösung in einem Gleichgewicht zweier konformerer Formen vor, weshalb in der HPLC neben einem Hauptpeak bei 13 min. ein weiterer Peak bei 14,7 min. zu beobachten ist.

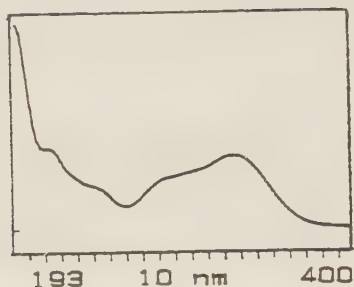
Abb.19 : Echinacosid



2.3.7. Verbindung H8: Verbascosid

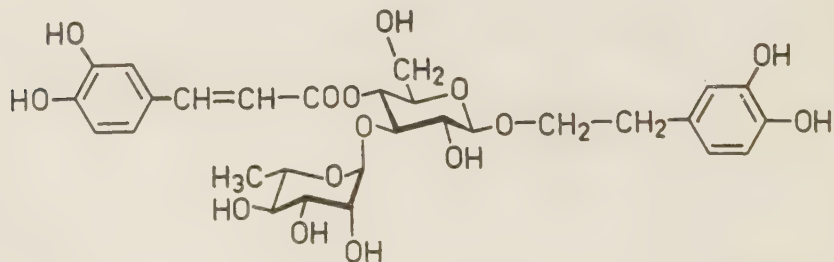
Verbindung H8 konnte nur in den oberirdischen Teilen von *E. angustifolia* gefunden werden. Das Detektionsverhalten sowie das UV-Spektrum (Abb.20) der im Mikromaßstab durch DC isolierten Substanz zeigten, daß sie eine strukturelle Verwandtschaft zu Echinacosid besitzen mußte.

Abb.20 : UV-Spektrum von Verbindung H8



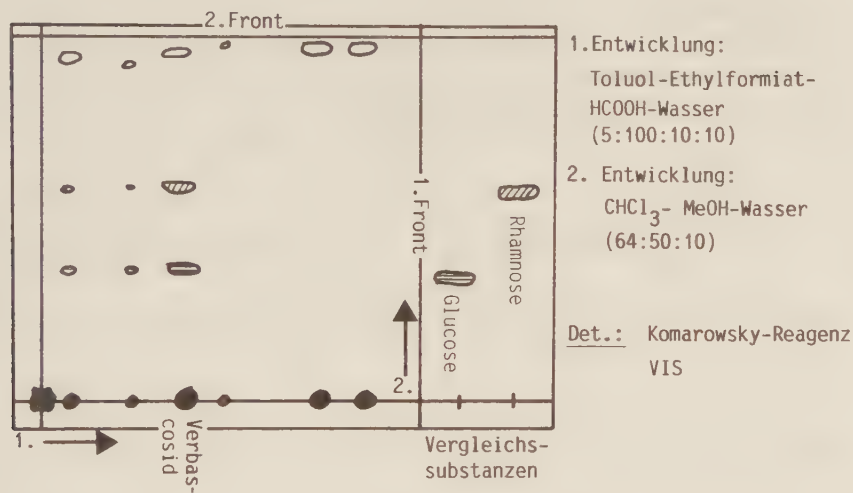
Ein Vergleich mit Referenzsubstanzen zeigte, daß Verbindung H8 identisch war mit Verbascosid, dem um ein Mol Glucose ärmeren Strukturanalogen zu Echinacosid (Abb. 21).

Abb.21 : Verbascosid



Durch Mikrohydrolyse auf DC-Platte und anschließende zweidimensionale Entwicklung konnten als Spaltprodukte erwartungsgemäß die Zucker Glucose und Rhamnose nachgewiesen werden (Abb.22).

Abb.22: Mikrohydrolyse und zweidimensionale Entwicklung eines verbascosidhaltigen Methanolextraktes aus dem Kraut von *E. angustifolia*



Caffeoylglykoside vom Echinacosid-Typ sind schon häufiger aus Pflanzen isoliert worden [68,83]. Verbascosid [β -(3',4'-Dihydroxyphenyl)-ethyl-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-(4-O-caffeoyl)-glucopyranosid] wurde bereits als "Acteosid" aus *Syringa vulgaris* [84], sowie aus *Orobancha rapum-genistae* [85] isoliert. Über das Vorkommen dieser Verbindung in der Gattung *Echinacea* war noch nicht berichtet worden.

2.3.8. Verbindung H10: Cynarin

Auch Verbindung H10 konnte durch Co-Chromatographie in verschiedenen DC- und HPLC-Trennsystemen, sowie durch Vergleich des UV-Spektrums identifiziert werden.

Es handelt sich dabei um Cynarin, einen weiteren Vertreter der Dicafeoyl-chinasäuren. Im Unterschied zu den Isochlorogensäuren ist Chinasäure hier jedoch in 1- und 5-Stellung jeweils mit einer Kaffeesäure verestert (Abb.23), wodurch das Absorptionsmaximum von 300 bis 325 nm eine charakteristische Verbreiterung erfährt (Abb.24).

Cynarin, das ursprünglich aus der Artischocke [86] isoliert worden war, ist damit erstmals in *Echinacea angustifolia*-Wurzeln nachgewiesen worden [32].

Abb.23 : Cynarin

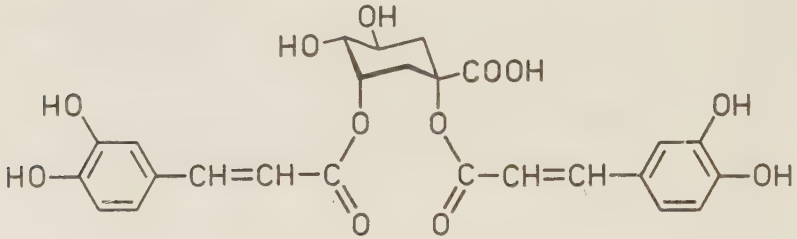
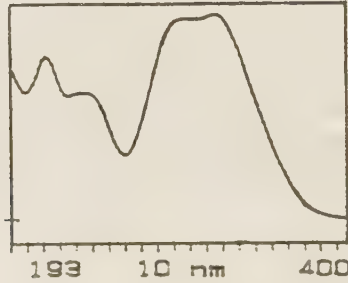


Abb.24 : UV-Spektrum von Cynarin



3. Isolierung und Strukturaufklärung von Alkylamiden aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia*

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die lipophilen Bestandteile von *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia* zu untersuchen. Wir verwendeten hierfür die Wurzeln der beiden Pflanzen, da in diesen nach ersten orientierenden Untersuchungen die lipophilen Inhaltsstoffe in höherer Konzentration und in größerer Vielfalt vorlagen als in den oberirdischen Teilen.

3.1. Voruntersuchungen

Für chromatographische Voruntersuchungen stellten wir aus den Wurzeln der beiden Arten Ethanol-, Ethylacetat-, Chloroform- und Hexan-Extrakte her.

Eine mit den Ethanolextrakten vorgenommene Geschmacksprobe zeigte, daß bereits wenige Tropfen beider Extrakte auf der Zungenspitze ein anfangs stark prickelndes Gefühl, später eine intensive lokalanästhetische Wirkung hervorriefen. Diese Erscheinung, die als "tingling effect" der *Echinacea*-Drogen bekannt ist, wird in der Literatur allgemein auf das Vorkommen von Alkylamiden zurückgeführt [43,87]. Somit war zu vermuten, daß die von uns hergestellten lipophilen Extrakte ebenfalls Alkylamide enthielten.

3.1.1. Dünnschichtchromatographie

Als bestes Laufmittel zur DC-Auftrennung der lipophilen Wurzelextrakte von *E. purpurea* und *E. angustifolia* wurde das System Hexan-Ethylacetat (2:1) (DC-T2) ermittelt. Es trennte die Hauptzonen im R_f-Bereich von 0.2 bis 0.7 gut auf.

Dabei zeigte sich, daß keine qualitativen Unterschiede im lipophilen Inhaltsstoffmuster der jeweiligen Chloroform-, Hexan-, Ethylacetat- und Ethanolextrakte auftraten. Da die beste Anreicherung in den Chloroform- und Hexanextrakten erreicht worden war, arbeiteten wir im folgenden hauptsächlich mit diesen Extrakten.

Zur Detektion verwendeten wir Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz [88], welches sich nach Testung zahlreicher anderer Sprühreagenzien als am geeignetsten erwies.

Abbildung 25 zeigt die dünnstschichtchromatographische Auftrennung der beiden Extrakte, sowie das Detektionsverhalten der einzelnen Zonen im UV 254 nm und nach Besprühen mit Anisaldehyd/H₂SO₄. Dabei wird erkennbar, daß sich die Alkylamidmuster von *E. purpureae* radix und *E. angustifoliae* radix deutlich voneinander unterscheiden. In früheren Untersuchungen wurde für *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia* dasselbe Amid-Inhaltsstoffmuster angegeben [46].

Die in beiden Extrakten vorkommende, nach Detektion mit Anisaldehyd/H₂SO₄ violett reagierende Zone bei R_f 0.65 konnte durch Co-Chromatographie als das bereits von VERELIS [89] gefundene β -Sitosterin identifiziert werden.

Durch präparative DC im Laufmittel Hexan-Ethylacetat (2:1) wurden anschließend die einzelnen Zonen in sehr kleinen Mengen isoliert bzw. angereichert, um sie anschließend den entsprechenden HPLC-Peaks zuzuordnen.

3.1.2. Hochleistungsflüssigchromatographie

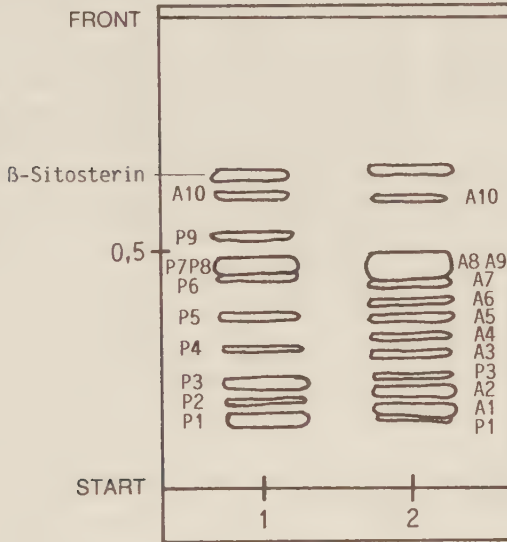
Für die Analyse der Alkylamide eignete sich ein Umkehrphasentrennsystem (RP-18) mit Acetonitril/Wasser als mobiler Phase.

Bei Extrakten aus *Echinacea purpureae* radix konnte durch einen Fließmittelgradienten von 40-60 % Acetonitril in 30 Minuten (HPLC-T2) eine gute Trennung der Bestandteile erreicht werden (Abb.26). Die empfindlichste Detektionswellenlänge lag bei 260 nm.

Für *Echinacea angustifoliae* radix entwickelten wir ein Gradientensystem von 40-80 % Acetonitril in 30 Minuten (HPLC-T3), welches eine scharfe Auftrennung der Komponenten ermöglichte (Abb.27). Als Detektionswellenlänge wählten wir hier 210 nm.

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme sowie der durch Photodiodenarray-Detektion aufgenommenen UV-Spektren der eluierten Substanzen machte deutlich, daß die Chloroformextrakte aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* jeweils sehr komplexe Gemische darstellen. Beide Extrakte besitzen zwar denselben Hauptinhaltsstoff (P7 = A8), unterscheiden sich jedoch in den anderen Bestandteilen.

Abb.25 : Dünnschichtchromatogramm der Chloroformextrakte aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia* und Detektionsverhalten der einzelnen Zonen



Zuordnung:

1: *E. purpureae* radix
CHCl₃-Extrakt

2: *E. angustifol.* radix
CHCl₃-Extrakt

LM: Hexan-Ethylacetat
(2:1)
= DC-T2

Zone	Fluoreszenz- mind. UV 254 nm	Anisaldehyd/ H ₂ SO ₄ /VIS
P1	+	violett
P2	-	gelb-braun
P3	+	violett
P4	+	violett
P5	+	violett
P6	+	violett
P7	+	braun-schwarz
P8	+	violett
P9	+	violett
A1	-	gelb
A2	-	gelb
A3	-	gelb
A4	-	gelb
A5	-	gelb
A6	+	blau
A7	-	gelb
A8	+	braun-schwarz
A9	-	gelb
A10	+	violett

Abb.26: HPLC-Chromatogramm des Chloroformextraktes aus den Wurzeln von *E. purpurea* (Trennsystem HPLC-T2)

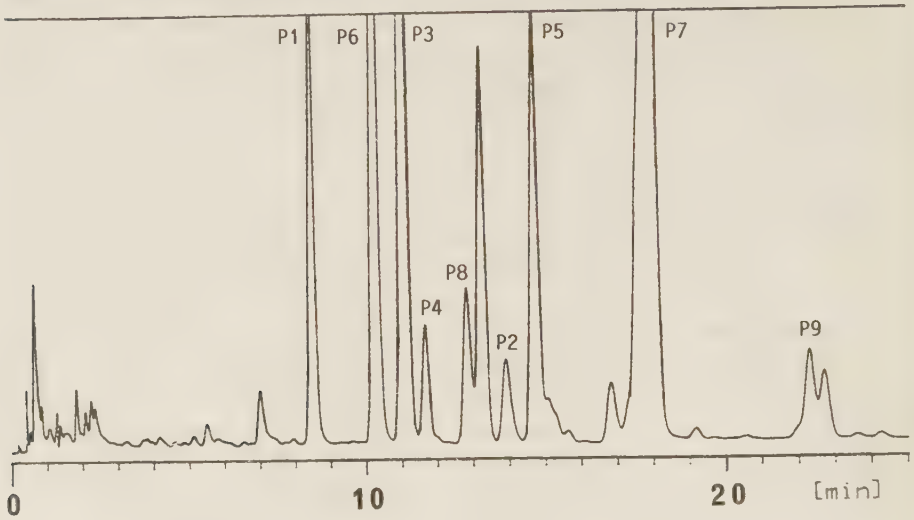
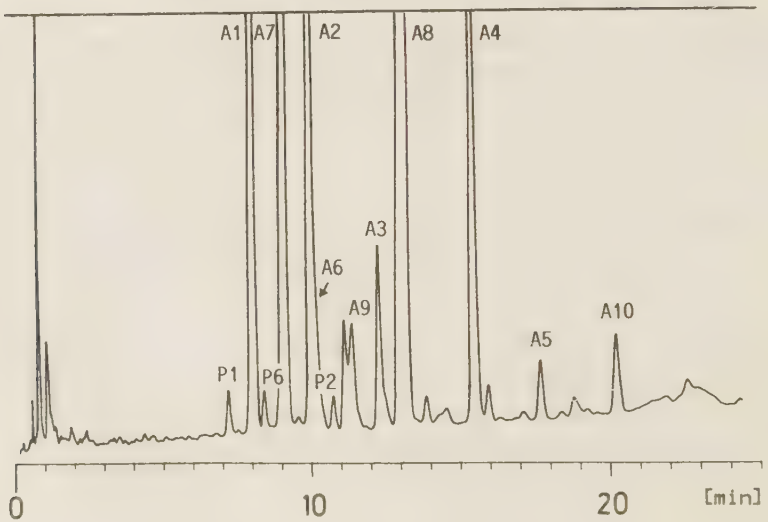


Abb.27: HPLC-Chromatogramm des Chloroformextraktes aus den Wurzeln von *E. angustifolia* (Trennsystem HPLC-T3)



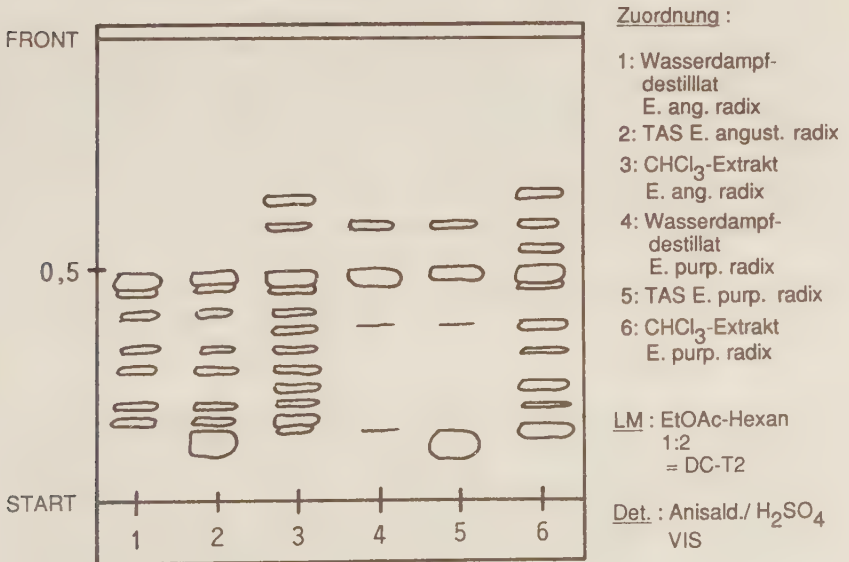
3.1.3. Wasserdampfdestillation und TAS-Verfahren

Um für die nachfolgende Isolierung weitere Informationen über die Alkylamide zu erhalten, wurden chromatographische Untersuchungen auch mit den Destillaten unternommen.

Dazu stellten wir von beiden Wurzeldrogen ein Wasserdampfdestillat in einer Neo-Clevenger-Apparatur her. Außerdem unterzogen wir die Drogen einer Thermomikro-Destillation nach STAHL (TAS-Verfahren) [90].

Die Destillate wurden anschließend dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 28).

Abb.28 : DC der Destillate aus *E. purpureae* radix und *E. angustifoliae* radix



Im Destillat von *E. purpurea* waren lediglich die Hauptbande (P7; Rf 0.5) und die darüberliegenden DC-Zonen nachweisbar. Bei *E. angustifolia* dagegen waren im Destillat neben der Hauptverbindung mehrere gelbe Zonen im unteren Rf-Bereich sichtbar, die auch im genuine Extrakt vorkamen und somit keine Artefakte darstellten.

Bei allen TAS-Proben war bei Rf 0.1 ein breiter, grün-schwarzer Fleck im VIS zu sehen, der offensichtlich Artefakte als Folge der thermischen Belastung enthielt.

Generell mußte jedoch festgestellt werden, daß die in der DC und HPLC detektierten Alkylamide nur sehr wenig flüchtig waren, so daß die Methode der Wasserdampfdestillation für eine Isolierung nur bedingt verwendet werden konnte.

3.2. Isolierung der Alkylamide

Wie die Voruntersuchungen bereits gezeigt hatten, war in beiden Wurzeldrogen jeweils ein komplexes Gemisch chromatographisch eng benachbarter Zonen bzw. Peaks enthalten. Zur Auftrennung dieser Substanzgemische in die Einzelkomponenten verwendeten wir die Niederdruck-, Mitteldruck- und Hochleistungsflüssigchromatographie. Durch Verwendung verschiedener stationärer Phasen (Kieselgel, RP-8, RP-18) erreichten wir in den verschiedenen Trennstufen unterschiedliche chromatographische Selektivitäten für die einzelnen Substanzen. Dieses Prinzip, das für die jeweilige Verbindung optimiert wurde, war die Grundlage der Isolierung der Alkylamide aus *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia*.

3.2.1. Echinaceae purpureae radix

3.2.1.1. Extraktion

Die Alkylamide waren sowohl in Chloroform als auch in n-Hexan gut löslich. Wir wählten als Extraktionsmittel n-Hexan, da sich gezeigt hatte, daß der Chloroformextrakt mehr hydrophile Begleitstoffe enthielt, die sich bei der Isolierung störend auswirken hätten können. Durch Soxhletextraktion aus 1,8 kg frisch pulverisierter *E. purpurea*-Wurzeln erhielten wir 12,4 g (= 0,7 %) eines braunen Spissum-Extraktes. Der Drogenrückstand wurde zur Isolierung der hydrophilen Inhaltsstoffe verwendet.

3.2.1.2. Niederdruck-Säulenchromatographie

Zur Fraktionierung des Hexan-Extraktes verwendeten wir zunächst die Flash-Säulenchromatographie mit Kieselgel als Adsorbens. Bei dieser Methode werden durch Anlegen eines geringen Überdruckes mit Preßluft oder Stickstoff (1 - 2 bar) verkürzte Trennzeiten bei erhöhter Trennleistung gegenüber der herkömmlichen offenen Säulenchromatographie bei normalem, atmosphärischem Druck erzielt [91].

Als Laufmittel wählten wir Hexan-Ethylacetat 3:1, da die zu isolierenden Verbindungen dadurch in einen für die Säulenchromatographie günstigen Retentionsbereich gebracht wurden. Die Fraktionen wurden anschließend dünnstschichtchromatographisch im Laufmittel DC-T2 untersucht und inhaltsgleiche Fraktionen vereinigt. Wir erhielten damit in dieser ersten Trennstufe Fraktionen, in denen die einzelnen Alkylamide stark angereichert waren.

3.2.1.3. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC) und semipräparative HPLC

Während das Retentionsverhalten organischer Verbindungen an Kieselgel hauptsächlich auf eine Adsorption der polarisierten Molekülteile an die polare, stationäre Phase beruht, liegen der Chromatographie auf Umkehrphasen (RP-2, RP-8, RP-18) in erster Linie Verteilungsvorgänge zwischen der wäßrigen mobilen Phase und den lipophilen stationären Gruppen zugrunde. Das Retentionsverhalten wird dabei vor allem durch den lipophilen Anteil des Moleküls bestimmt. Somit kann die chromatographische Auftrennung und teilweise auch die Elutionsreihenfolge auf Kieselgel und Umkehrphasen sehr verschieden sein. Diese unterschiedlichen Selektivitäten machten wir uns für die Isolierung der Alkylamide zunutze, indem wir die präparativen Trennungen sukzessive an verschiedenen stationären Phasen durchführten.

Die Sammelfractionen der Kieselgel-Säulenchromatographie wurden zunächst durch analytische HPLC im Trennsystem HPLC-T2 untersucht.

1. Für die weitere Auftrennung von Fraktionen, in denen die Verbindungen sehr unterschiedliche α -Werte besaßen, verwendeten wir die Mitteldruckflüssigchromatographie auf RP-8-Material, die sich durch eine hohe Kapazität bei mittlerer Trennleistung auszeichnet. Je nach Retentionszeit der zu trennenden Substanzen wählten wir als Elutionsmittel 40 %, 50 % oder 60 % Acetonitril in Wasser. Die aufgefundenen Fraktionen wurden anschließend durch DC im Laufmittel DC-T2 und durch analytische HPLC im Trennsystem HPLC-T2 untersucht.

Zwei MPLC-Fractionen enthielten chromatographisch reine Substanzen, die den Verbindungen P6 und P7 zugeordnet werden konnten. Sie wurden mit n-Hexan ausgeschüttelt. Aus den eingeeengten Hexanlösungen fielen in der Kälte jeweils weiße Nadeln aus. Auf diese Weise konnten von Verbindung P6 23 mg und von P7 60 mg weiße, nadelförmige Kristalle gewonnen werden.

2. Für die Fraktionen der Kieselgelsäule, die Verbindungen mit sehr ähnlichen α -Werten enthielten, sowie für MPLC-Fractionen aus 1., die noch keine Reinsubstanzen darstellten, wählten wir als nächste Trennstufe die semipräparative HPLC auf reversed-phase-Trennmaterial (RP-18). Diese Methode zeichnet sich durch hohe Trennleistung bei relativ niedriger Kapazität aus und stellt deshalb meist den letzten Isolierungsschritt dar. Der Anteil an Acetonitril im Elutionsmittel richtete sich nach dem Retentionsverhalten der jeweiligen Substanz und variierte von 40 bis 55 % (isokratisch). Ein UV-Detektor registrierte die eluierten Substanzen, wobei wir eine Detektionswellenlänge von 260 nm wählten. Die Reinheit der aufgefangenen Verbindungen wurde anschließend mit HPLC überprüft.

Auf diese Weise isolierten wir aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea* 10 mg P1 (weiße Nadeln aus Hexan), 8 mg P2 (farbloses Öl), 8 mg P3 (weiße Nadeln aus Hexan), 3 mg P4 (farbloses Öl), 5 mg P5 (farbloses Öl), 2 mg P8 (farbloses Öl) und 5 mg P9 (farbloses Öl).

3.2.2. Echinaceae angustifoliae radix

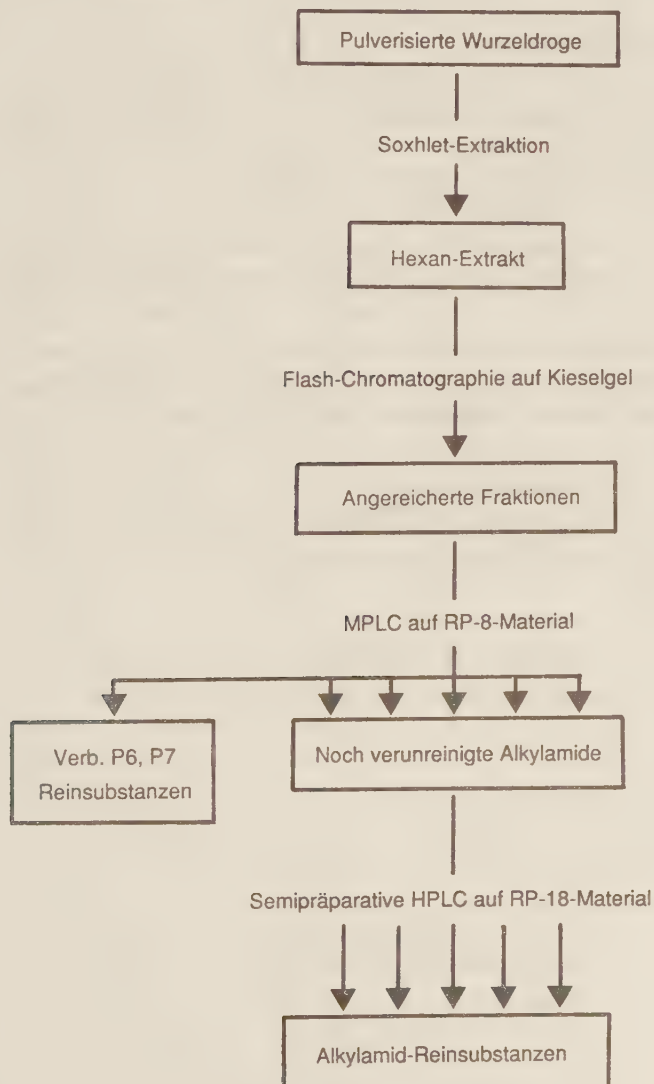
Die Isolierung der Alkylamide aus *Echinaceae angustifoliae radix* erfolgte analog der oben geschilderten Methode für *E. purpureae radix*.

300 g pulverisierte Wurzeln von *Echinacea angustifolia* wurden mit n-Hexan am Soxhlet erschöpfend extrahiert. Der gelbliche, zähflüssige Extrakt (8,7 g = 2,9 %) wurde auf eine Kieselgelsäule aufgegeben. Als Laufmittel verwendeten wir das System Hexan-Ethylacetat 5:1.

Da die einzelnen Verbindungen im Wurzelextrakt von *E. angustifolia* chromatographisch noch dichter zusammenlagen als in *E. purpurea* und durch die MPLC keine ausreichend guten Trennungen zu erwarten waren, verwendeten wir für die nächste

Trennstufe die semipräparative HPLC auf einer Umkehrphase. Die optimale Detektionswellenlänge lag bei 210 nm. Der Acetonitril-Anteil im Elutionsmittel betrug 40 bis 75 % (isokratisch).

Abb.29: Schematischer Isolierungsgang der Alkylamide aus *Echinacea purpurea*-Wurzeln



Auf diese Weise konnten wir aus den Wurzeln von *Echinacea angustifolia* 9 mg A1 (farblose Nadeln aus Hexan), 7 mg A2 (farblose Nadeln aus Hexan), 2 mg A3 (farblo- ses Öl), 4 mg A4 (farblo- ses Öl), 2 mg A5 (farblo- ses Öl), 4 mg A6 (farblo- ses Öl), 30 mg A7 (farblo- ses Öl), 2 mg A9 (farblo- ses Öl) und 30 mg A10 (farblo- ses Öl) als Reinsubstanzen isolieren.

3.3. Strukturaufklärung der Alkylamide

3.3.1. Alkylamide aus *Echinaceae purpureae* radix

3.3.1.1. P6 : Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

Das IR-Spektrum von Verbindung P6 (Abb.31) zeigte für sekundäre Amide charakte- ristische Banden bei 3300, 3080, 1660 und 1550 cm^{-1} . Weitere Absorptionsbanden im Bereich von 2220 cm^{-1} sprachen für das Vorhandensein acetylenischer Bindungen im Molekül. Darüberhinaus waren Banden bei 1620 und 990 cm^{-1} zu erkennen, die von olefinischen Doppelbindungen stammen mußten. Nach GREGER [92] ist insbesondere die Bande bei 990 cm^{-1} auf eine Konjugation der Carbonylgruppe des Säureamids mit zwei Doppelbindungen zurückzuführen.

Das UV-Spektrum von P6 wies ein Absorptionsmaximum bei 257 nm ($\epsilon = 19.300$) (Abb.30) auf und bestätigte das Vorliegen eines Dienamid-Chromophors.

Abb.30 : UV-Spektrum von Verbindung P6

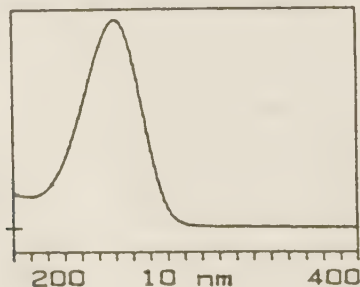
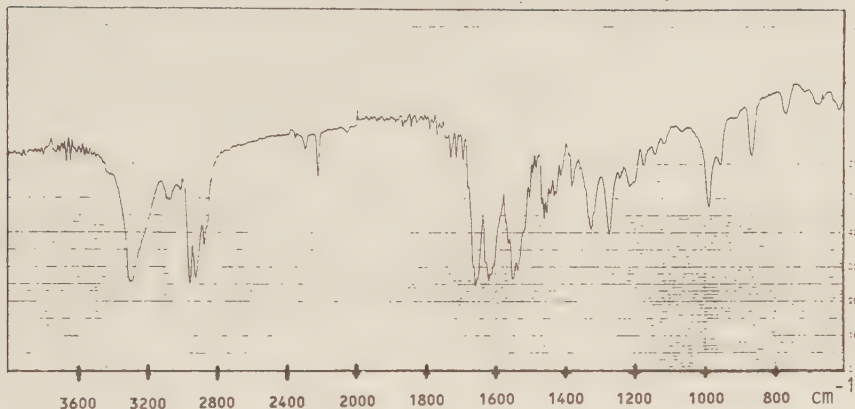


Abb.31 : IR-Spektrum von Verbindung P6



Das CI-Massenspektrum (NH_3) von P6 lieferte Pseudomolekülpeaks bei m/z 230 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) und m/z 247 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$), was beweisend war für ein Molekulargewicht von 229, entsprechend einer Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}$. Daneben wurde ein EI-Massenspektrum aufgenommen, um durch Fragmentierungen weitere Strukturinformationen zu erhalten (Abb.32). Neben dem erwarteten Molekülpeak bei m/z 229 waren Fragmente bei m/z 214 ($[\text{M}-\text{CH}_3]^+$), 186 ($[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$), 172 ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$) und 157 ($[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$) zu erkennen. Dieses Fragmentierungsmuster ist charakteristisch für das Vorliegen einer Isobutylamidgruppierung (Abb.33). Der base-peak bei m/z 128 spricht für einen Bindungsbruch zwischen C-1 und C-2 im Säureanteil. Die Differenz von einer Masseneinheit ist dabei nach MARTIN [61] durch den Verlust eines weiteren Wasserstoffatoms zu erklären.

Das 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum (Abb.34) bestätigte die Anwesenheit einer Isobutylamidgruppe. Ein Dublett für sechs Protonen bei 0,93 ppm mit der Kopplungskonstante von 7 Hz stammte von den beiden magnetisch äquivalenten Methylgruppen (H-3', H-4'). Das tertiäre Proton H-2' lieferte ein stark aufgespaltenes Signal (tq) bei 1,80 ppm. Die beiden äquivalenten Methylenprotonen H-1' ($\delta = 3,14$ ppm) zeigten eine Spinkopplung sowohl mit dem Stickstoffproton als auch mit dem Methinproton H-2'. Da die beiden Kopplungskonstanten gleich groß waren ($J=7$ Hz), resultierte daraus ein Signal, welches wie ein Triplet erschien, in Wirklichkeit jedoch ein Dublett-

Dublett darstellte.

Abb.32 : EI-Massenspektrum der Verbindung P6

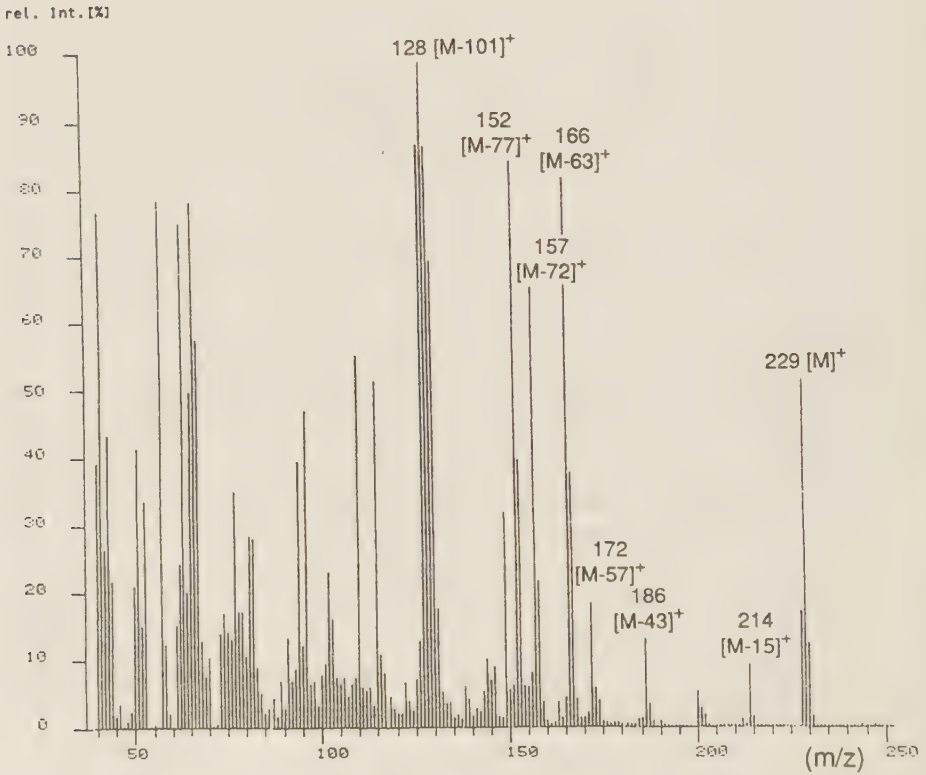
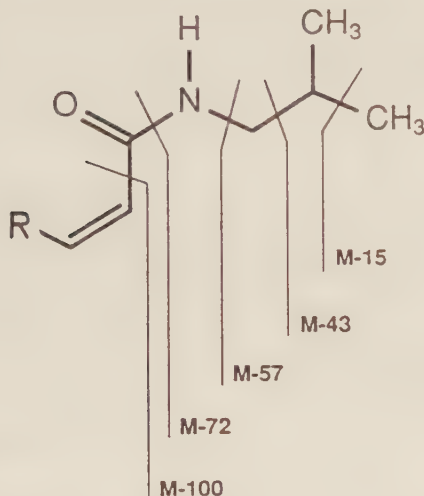
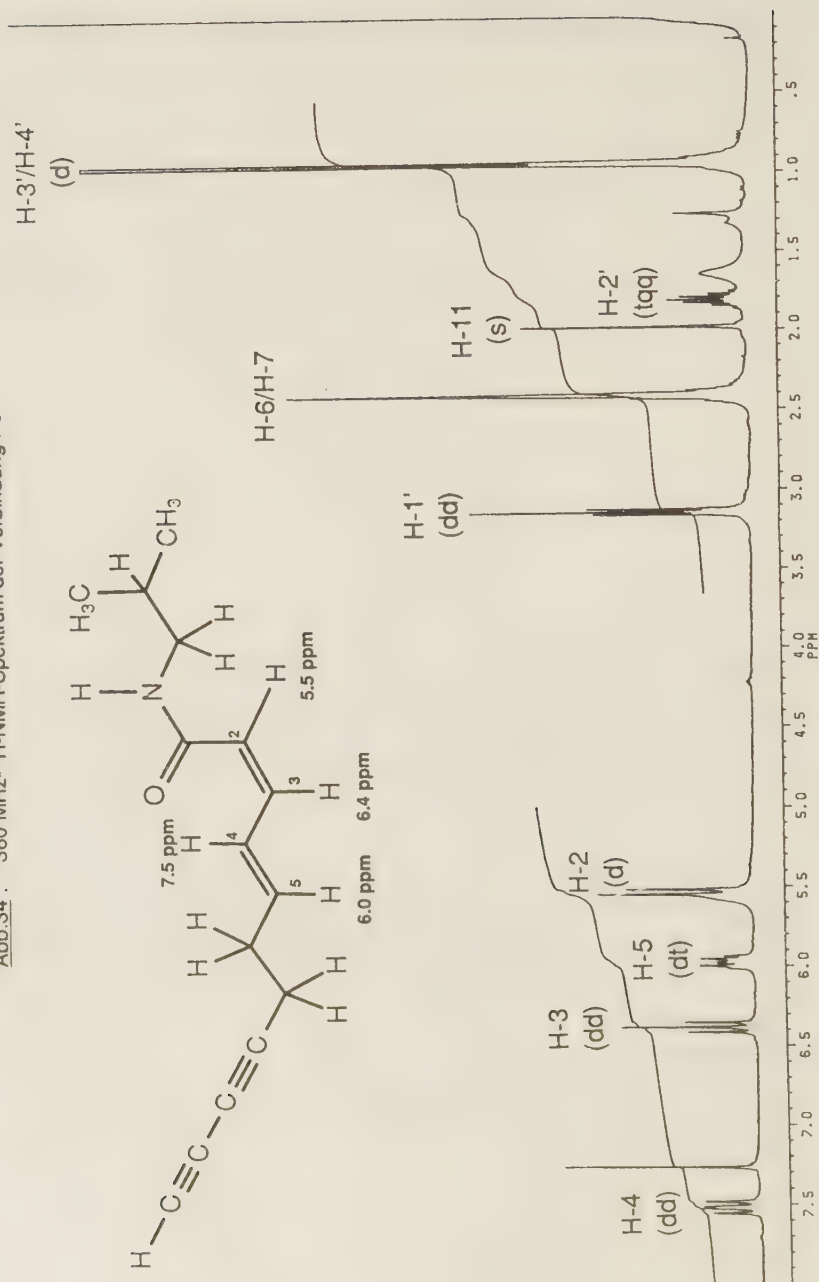


Abb.33 : Massenspektrometrische Fragmentierungen des Isobutylaminrestes



Im Bereich von 5 bis 8 ppm waren neben dem stark verbreiterten, überlagerten Signal des Stickstoffprotons vier weitere Signale sichtbar, die von den vier olefinischen Protonen H-2 bis H-5 stammten. Demzufolge waren keine weiteren Doppelbindungen im Molekül enthalten. Um die Signale zuordnen zu können führten wir Doppelresonanzexperimente durch.

Das Dublett bei 5,53 ppm war eindeutig dem Proton H-2 zuzuordnen. Die Kopplungskonstante von 11 Hz bewies die Z-Konfiguration der α,β -Doppelbindung. Durch Einstrahlung bei H-2 vereinfachte sich das Triplett ($J=11$ Hz) des Kopplungspartners H-3 bei 6,38 ppm zu einem Dublett. Gleichzeitig wurde erkennbar, daß es sich bei dem Signal von H-3 um kein Triplett, sondern wiederum um ein Dublett-Dublett mit gleicher Kopplungskonstante von 11 Hz handelte. Da bei der Bestrahlung von H-2 auf die überlagerte Resonanz des Stickstoffprotons ebenfalls eingestrahlt wurde, änderte sich das Dublett-Dublett des benachbarten H-1' bei 3,14 ppm dabei zu einem einfachen Dublett.

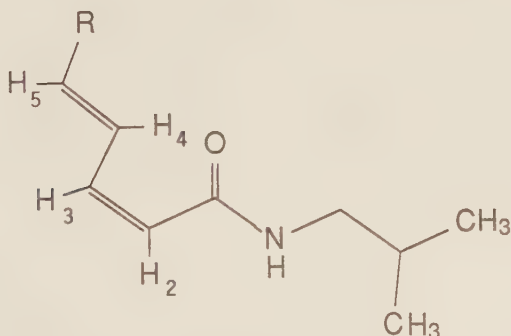
Abb.34 : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung P6

Aus der Multiplizität der restlichen Resonanzsignale im olefinischen Bereich war daraufhin abzuleiten, daß das Dublett-Dublett bei 7,51 ppm ($J=15;11$ Hz) von H-4, das Dublett-Triplett bei 5,98 ppm ($J=15;7$ Hz) von H-5 stammen mußte, wobei die Kopplungskonstante von 15 Hz beweisend war für die E-Konfiguration der γ,δ -Doppelbindung. Die Einstrahlung an H-4 veränderte folglich die Signale bei 6,38 ppm (H-3) zu einem Dublett, sowie bei 5,98 ppm (H-5) zu einem Triplett.

Die stark tieffeldverschobene Resonanzlage des Protons H-4 überraschte zunächst, da für α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen eigentlich eine Tieffeldverschiebung von H-3 zu erwarten gewesen wäre. Dieses abweichende Verhalten ist jedoch durch die sterische Anordnung der α,β -Doppelbindung erklärbar. Durch die Z-Konfiguration gerät das Proton H-4 in räumliche Nachbarschaft zur Carbonylgruppe (Abb.35). Diese verursacht durch Anisotropieeffekte Bereiche unterschiedlicher lokaler Feldstärken, wodurch die Resonanz des Protons H-4 eine starke Verschiebung ins tiefe Feld erfährt.

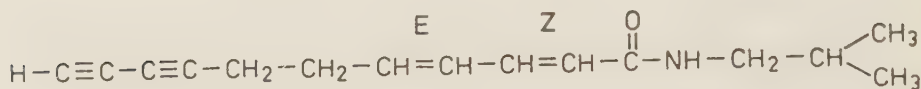
Das Singulett bei 1,98 ppm für ein Proton zeigte bei starker Vergrößerung des Spektrums eine Triplett-Unterstruktur mit sehr kleiner Kopplungskonstante (0,5 Hz), die durch eine long-range-Kopplung hervorgerufen wurde. Folglich sollte dieses Signal von einem endständigen, acetylenischen Proton (H-11) stammen.

Abb.35: Räumliche Anordnung der Wasserstoffatome bei einer 2Z-Doppelbindung in Alkylamiden



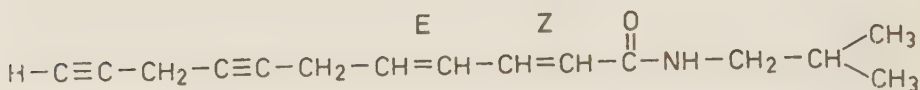
Das Integral des Signals bei 2,40 ppm entsprach vier Protonen, so daß hier offensichtlich die Signale zweier Methylengruppen überlagert waren. Aufgrund der bisherigen spektroskopischen Daten kamen nur noch zwei Strukturen für Verbindung P6 in Frage:

1.



oder

2.



Im ersten Fall sollte sich das Signal bei 2,40 ppm aus einem Triplett und einem Dublett-Triplett zusammensetzen, während im zweiten Fall ein Singulett und ein Dublett überlagert sein mußten. Aufgrund der Struktur des Signals konnte zunächst keine Entscheidung getroffen werden. Auch die Spinentkopplung durch Einstrahlung der Frequenz des Nachbarprotons H-5 erzeugte keine klar interpretierbaren Signale der Methylengruppen. Erst durch Änderung des verwendeten Lösungsmittels von CDCl_3 zu $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_6$ 1:1 konnte ein Aufsplitten der Signale in ein Triplett und ein Dublett-Triplett erreicht werden (Abb.36), womit eindeutig die Struktur 1 bewiesen war. Verbindung P6 konnte somit als Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-iso-butylamid identifiziert werden (Abb.37). Von BOHLMANN und Mitarb. [46] wurde diese Substanz bereits früher in Echinacea-Arten aufgefunden.

Abb.36 : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von P6 in $\text{CDCl}_3/\text{C}_6\text{D}_6$ 1:1 (Ausschnitt)

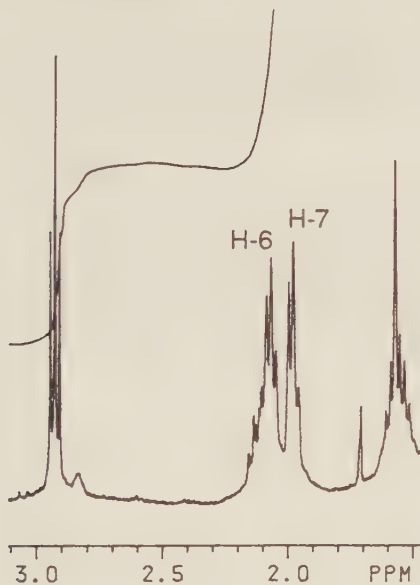
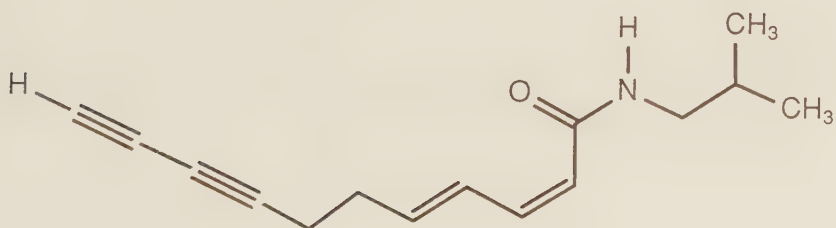


Abb.37 : Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P6)



3.3.1.2. P1 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

Die Verbindung P1 mußte nach den UV-, IR-^{*} und EI-Massenspektren (M^+ 229) mit der vorher besprochenen Verbindung P6 strukturverwandt sein. Lediglich die Intensitäten einzelner Fragmente im Massenspektrum waren etwas unterschiedlich. Daher war das Vorliegen eines Isomeren zu P6 wahrscheinlich.

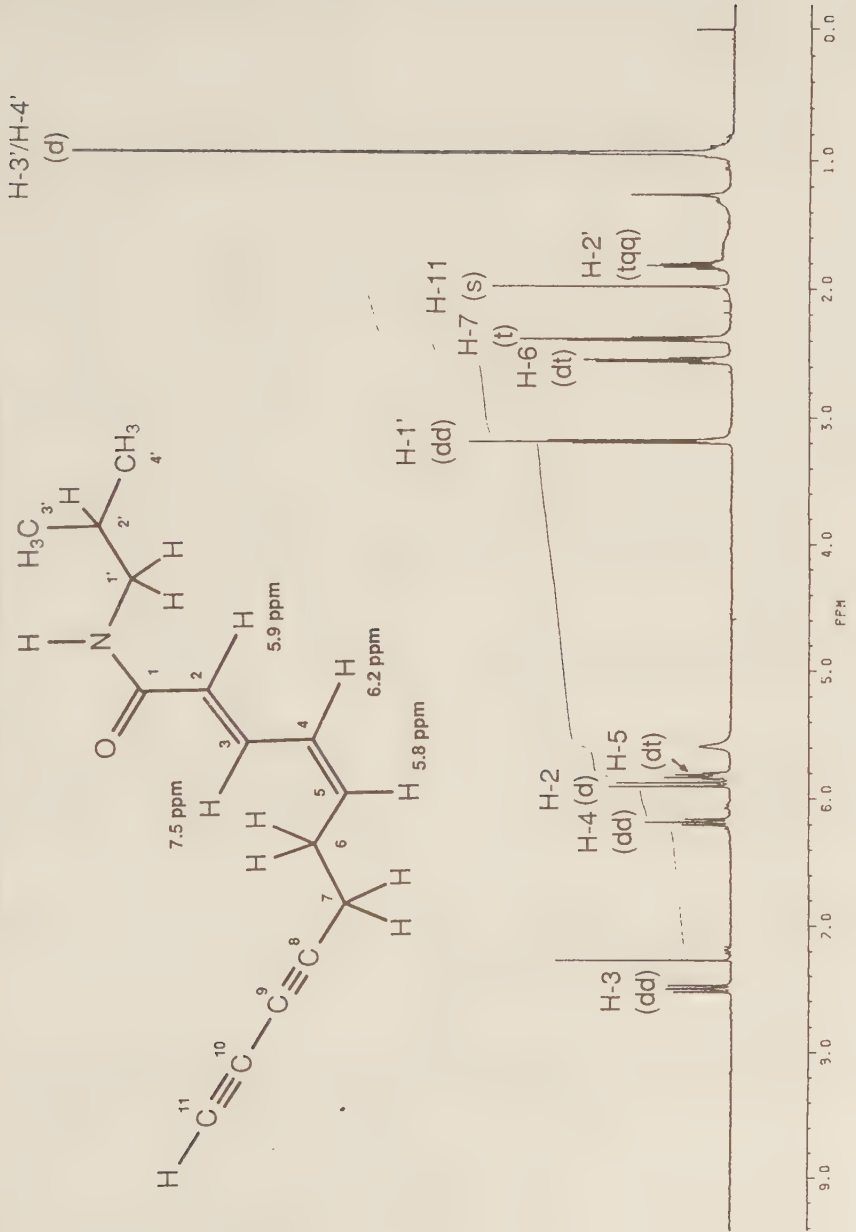
Im 500 MHz-¹H-NMR-Spektrum von Verbindung P1 (Abb.38) waren wiederum die typischen Signale der Isobutylamidgruppe bei 0,93, 1,81 und 3,18 ppm erkennbar. Ebenso war die Resonanzlage des endständigen acetylenischen Protonensignals bei 1,98 ppm unverändert. Die Signale der beiden Methylengruppen H-6 und H-7 waren hier in CDCl₃ gut getrennt und erschienen als Triplett bei 2,38 ppm (H-7; J=7 Hz; mit long-range-Kopplung zu H-11) und als Dublett-Triplett bei 2,55 ppm (H-6; J=7;7 Hz).

Daraus folgte, daß sich P1 von P6 lediglich durch die sterische Anordnung der Doppelbindungen unterschied.

Das Dublett von H-2 bei 5,88 ppm wies eine Kopplungskonstante von 15 Hz auf, was beweisend war für die E-Konfiguration der α,β -Doppelbindung. Als Kopplungspartner von H-2 kam nur das als Dublett-Dublett bei 7,49 ppm erscheinende Proton H-3 (J=15; 11 Hz) in Frage. Das Dublett-Dublett bei 6,17 ppm (J=11;11 Hz) stammte von H-4, während das Dublett-Triplett bei 5,84 ppm (J=11;8 Hz) dem Proton H-5 zuzuordnen war. Verbindung P1 besaß also bezüglich der Doppelbindungen die genau umgekehrte Stereochemie gegenüber P6, nämlich eine 2E,4Z-Konfiguration.

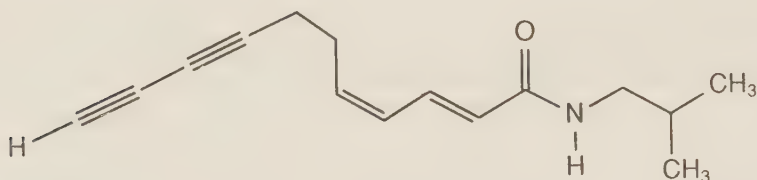
Entsprechend dem räumlichen Abstand von H-4 und Carbonylgruppe befand sich die Resonanzlage von H-4 nun im höheren Feld, während das Proton H-3 verglichen mit P6 im tieferen Feld zur Resonanz kam.

* Das IR-Spektrum eignet sich zwar, um das Vorliegen eines Alkylamids zu erkennen, besitzt jedoch für die weitere Strukturaufklärung relativ wenig Aussagekraft. Im folgenden soll deshalb nur auf abweichende IR-Spektren eingegangen werden. Die Beschreibungen aller IR-Spektren befinden sich im Experimentellen Teil.

Abb.38 : 500 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung P1

Die Struktur von Verbindung P1 wurde somit als Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid aufgeklärt (Abb.39). Diese Verbindung war bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Abb.39 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P1)



3.3.1.3. P3 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid

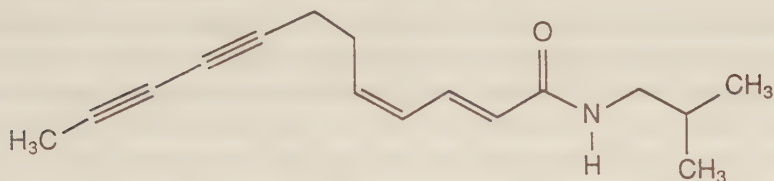
Verbindung P3 wies dasselbe UV-Spektrum ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$) und IR-Spektrum wie die beiden vorherigen Amide auf.

Das EI-Massenspektrum zeigte jedoch einen Molekülpeak bei m/z 243, was auf eine Summenformel von $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}$ schließen ließ. Da die Fragmentierung wiederum einen Isobutylaminanteil erkennen ließ, sollte es sich bei Verbindung P3 um ein Methylderivat oder ein Homologes zu P6 oder P1 handeln.

Das 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von P3 war mit dem Spektrum des Alkylamids P1 nahezu identisch. Lediglich das Singulett bei 1,98 ppm integrierte nun für drei Protonen, was auf eine terminale Methylgruppe zurückzuführen war.

Verbindung P3 stellte somit das Methylderivat zu P1 dar, das Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Abb.40). Es handelt sich ebenfalls um eine bisher nicht beschriebene Verbindung.

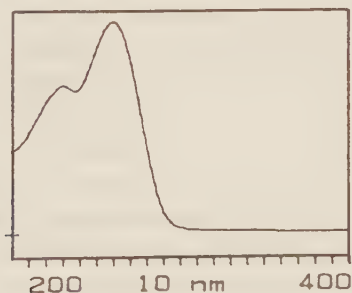
Abb.40 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P3)



3.3.1.4. P8 : Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid

Das UV-Spektrum von P8 (Abb.41) zeigte neben dem Absorptionsmaximum bei 261 nm eine Schulter bei 232 nm. Folglich mußte neben der Dienamid-Struktur eine weitere chromophore Gruppe im Molekül enthalten sein.

Abb.41 : UV-Spektrum der Verbindung P8



Das Molekulargewicht von 245, entsprechend einer Summenformel $C_{16}H_{23}NO$, ließ sich aus dem EI-Massenspektrum ableiten. Das Fragmentierungsmuster wies auf das Vorliegen eines Isobutylamides hin.

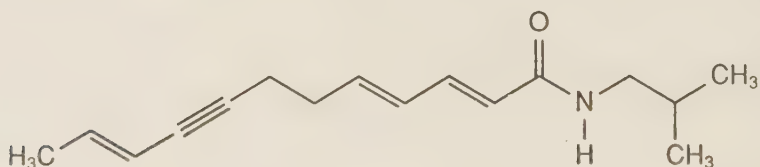
Im 500 MHz- 1H -NMR-Spektrum waren neben den Signalen der Isobutylamingruppe sechs Signalgruppen im olefinischen Bereich erkennbar. Die Zuordnung der vier

Protonen H-2 bis H-5 erfolgte analog zu den vorher beschriebenen Amiden. Die sterische Anordnung der Doppelbindungen war abweichend davon 2E,4E.

Ein stark strukturiertes Dublett bei 5,46 ppm ($J=15$ Hz) sowie ein Multiplett bei 5,88 ppm mußten von den Protonen einer weiteren Doppelbindung stammen. Aufgrund des UV-Absorptionsmaximums bei 232 nm war diese mit einer Dreifachbindung konjugiert. Die Feinaufspaltung des Dubletts war auf eine Allylkopplung zurückzuführen. Diese fand sich in einem Dublett-Dublett bei 1,83 ppm ($J=6; 1$ Hz) wieder. Die Integration zeigte die drei Protonen der endständigen Methylgruppe an.

Aufgrund dieser spektroskopischen Daten sollte es sich bei Verbindung P8 um das Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid (Abb.42) handeln, über das in der Literatur bisher noch nicht berichtet worden war.

Abb.42 : Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid (Verb. P8)



3.3.1.5. P7 : Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid

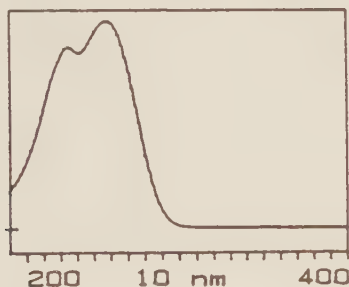
Das Alkylamid P7 war nach den DC- und HPLC-Voruntersuchungen sowohl in den Wurzeln von *E. purpurea* als auch in *E. angustifolia* die mengenmäßig dominierende Verbindung. Die Substanz kristallisierte aus Hexan in feinen weißen Nadeln vom Schmelzpunkt 70°C.

Bei der Reinheitsprüfung der Verbindung in der analytischen HPLC zeigten sich zwei nicht vollständig getrennte Peaks in einem Verhältnis von etwa 1:1. Demzufolge stellte Verbindung P7 ein Mischkristallisat aus zwei Verbindungen dar. Da diese chromatographisch nicht zu trennen waren, versuchten wir, die einzelnen Komponenten

ten aus dem Gemisch zu identifizieren.

Die online aufgenommenen UV-Spektren der beiden Verbindungen waren identisch und zeigten neben dem Hauptmaximum bei 260 nm ($\epsilon = 28.500$) ein weiteres Absorptionsmaximum bei 231 nm ($\epsilon = 24.000$) (Abb.43). Ähnlich wie bei P8 sollten also auch hier 2,4-Dien-amide vorliegen, die zusätzlich konjugierte ungesättigte Gruppen enthielten.

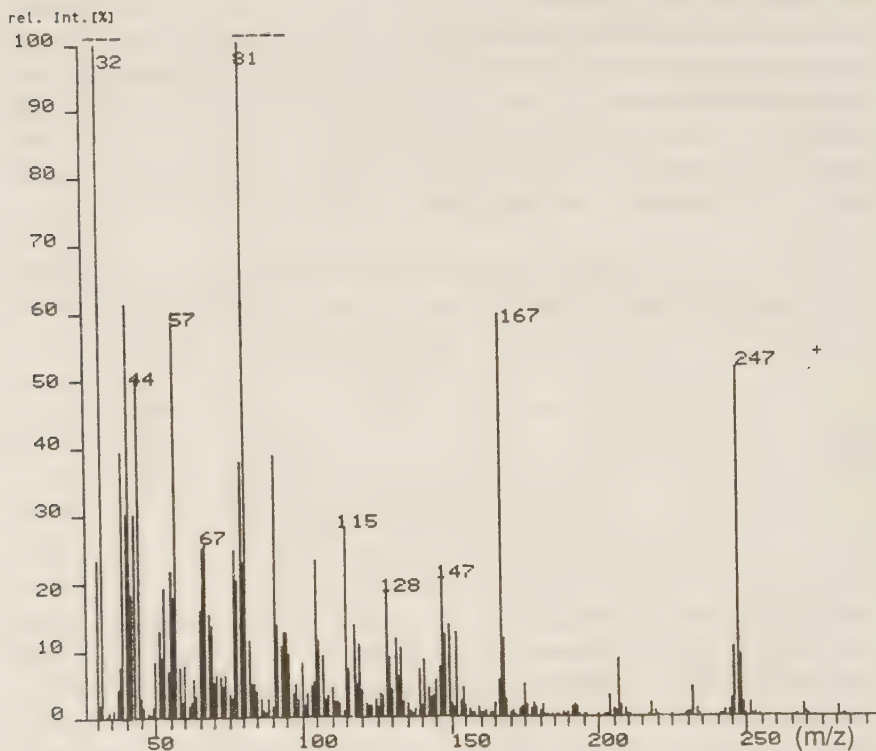
Abb.43 : UV-Spektrum von Verbindung P7



Das EI-Massenspektrum des Gemisches (Abb.44) wies nur einen Molekülpeak bei m/z 247 auf ($C_{16}H_{25}NO$). Infolgedessen mußte es sich bei den Substanzen um Isomere handeln. Neben den bekannten Fragmenten der Isobutylamingruppe waren besonders die hohen Intensitäten der Bruchstücke bei m/z 81 und 167 auffällig. Nach Aufklärung der Strukturen war dies verständlich, da die beiden Fragmente aus der besonders begünstigten doppelten Allylsplaltung zwischen C-6 und C-7 entstanden waren.

Die Aufnahme eines 360 MHz- 1H -NMR-Spektrums des Substanzgemisches (Abb.45) zeigte ein komplexes Signalmuster im olefinischen Bereich. Die Integration der Signalfächen machte dabei deutlich, daß einige Signale beiden Substanzen zuzuordnen waren, während andere nur von einer einzelnen Verbindung stammen konnten.

Abb.44 : EI-Massenspektrum des Substanzgemisches P7



Um die einzelnen Signale des Gemisches den jeweiligen Einzelverbindungen zuordnen zu können, nahmen wir ein zweidimensionales ^1H - ^1H -Korrelationsspektrum (COSY) der Mischung bei 500 MHz auf.

Abbildung 46 zeigt das gesamte COSY-Spektrum der Mischung, während Abbildung 47 einen vergrößerten Ausschnitt daraus darstellt. Zur besseren Zuordnung wurden die eindimensionalen Spektren jeweils unterlegt. In der linken oberen Hälfte wurde dabei teilweise durch Verbindung der Crosspeaks die Protonensequenz des Säureanteils der ersten Verbindung dargestellt, während diejenige der zweiten Verbindung in der rechten unteren Hälfte angedeutet wurde.

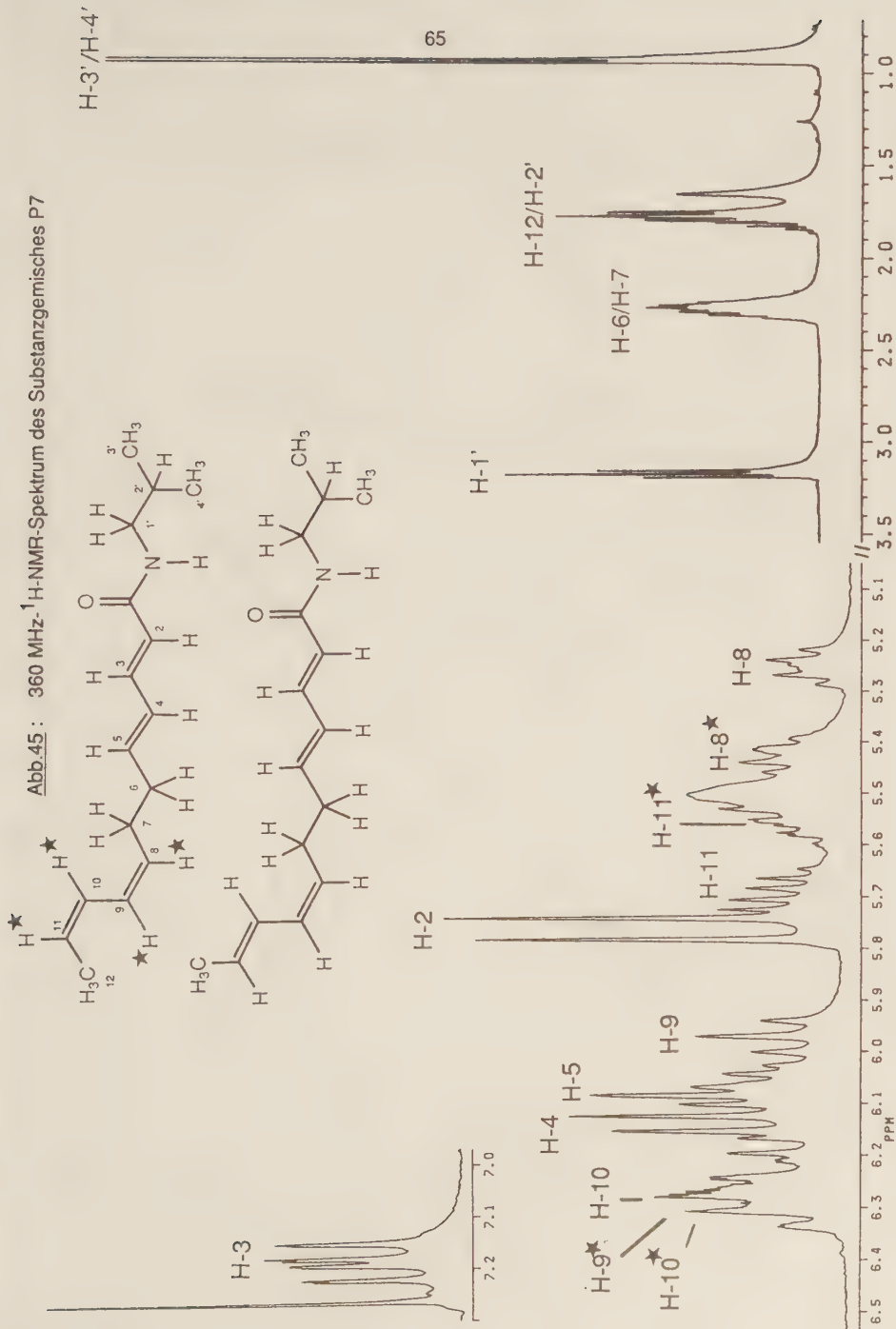


Abb.46 : 500 MHz-COSY-NMR-Spektrum des Substanzgemisches P7

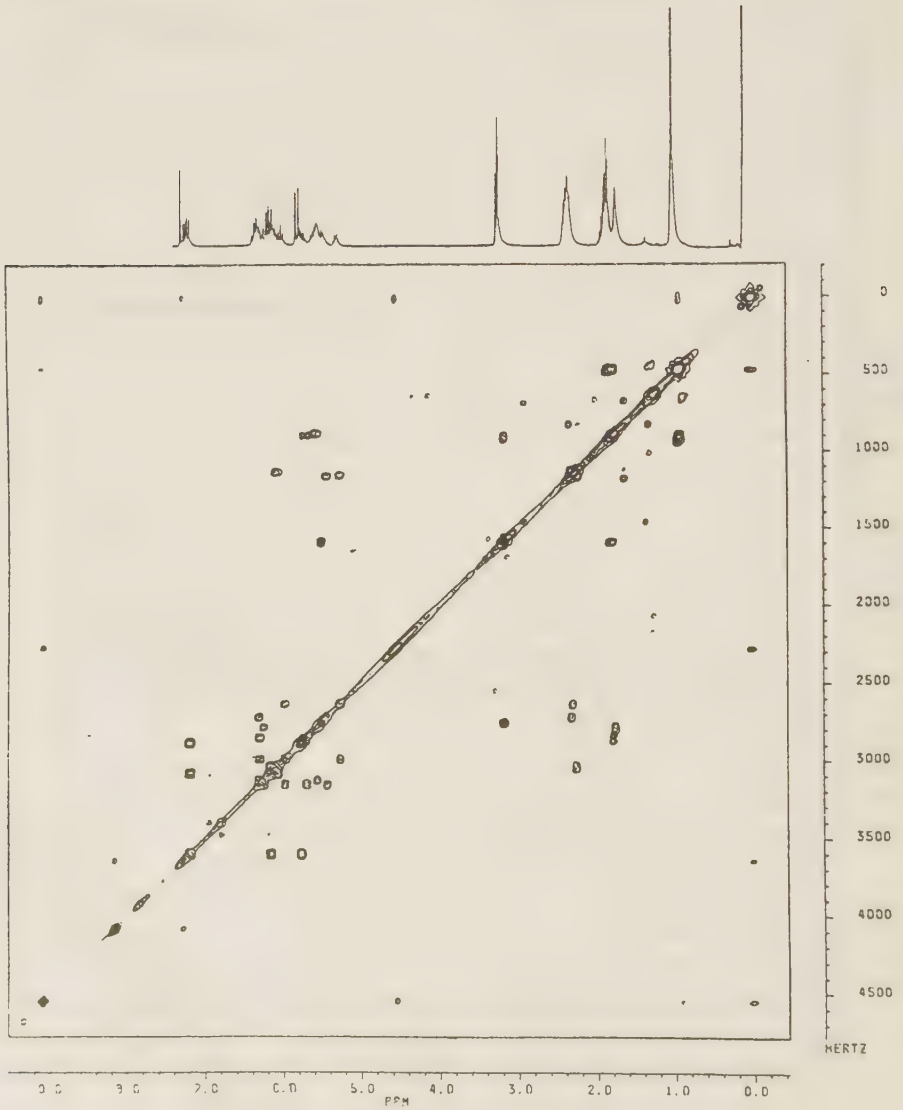
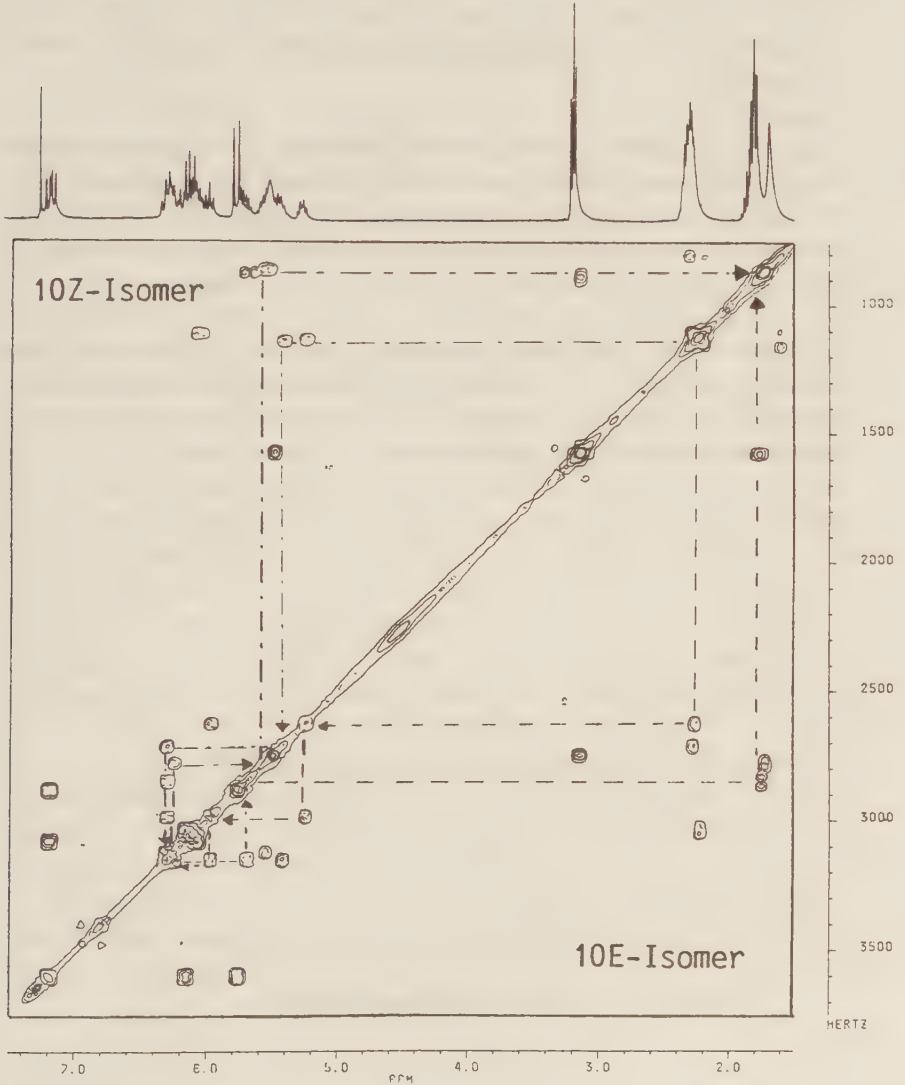


Abb.47 : 500 MHz-COSY-NMR-Spektrum des Substanzgemisches P7 (Ausschnitt)

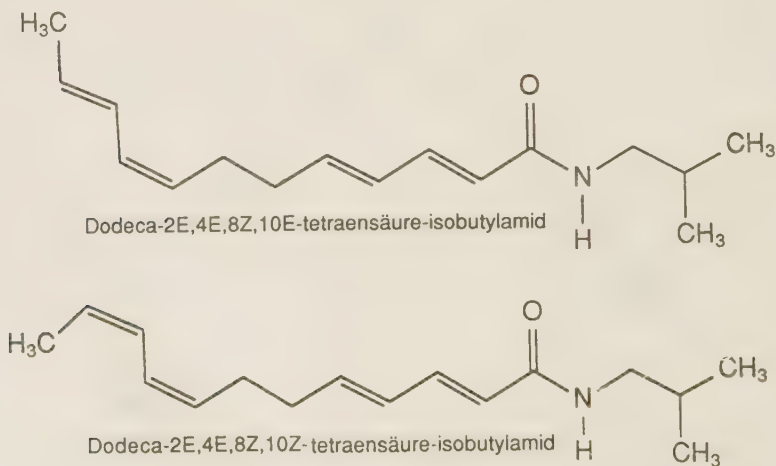


Auf diese Art konnten die zwei Protonensequenzen von H-2 bis H-12 festgelegt werden. Dabei zeigte sich, daß die Signale von H-2 bis H-7 beider Substanzen identisch waren. Die restlichen Signale im olefinischen Bereich für insgesamt acht Protonen unterschieden sich in ihrer chemischen Verschiebung, was den Schluß nahelegte, daß in jeder Verbindung jeweils zwei konjugierte Doppelbindungssysteme vorlagen, wobei die stereochemische Anordnung der olefinischen Protonen an C-8 bis C-11 verschieden sein mußte.

Um die genaue sterische Anordnung der Doppelbindungen zu klären, sowie die aus dem COSY-Spektrum getroffene Signalzuordnung zu bestätigen, führten wir zusätzliche Doppelresonanzexperimente durch. Durch Einstrahlung in die jeweiligen Frequenzbereiche wurden die Spinsysteme vereinfacht, so daß aus vorher überlagerten Signalen nun die entsprechenden Kopplungskonstanten abgelesen werden konnten.

Verbindung P7 wurde somit als eine Mischung der Isomeren Dodeca-2E,4E,8Z,10E-tetraensäure-isobutylamid und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraensäure-isobutylamid identifiziert (Abb.48). Diese beiden Amide sind die mengenmäßig dominierenden Alkylamide in *E. purpureae* radix und *E. angustifoliae* radix.

Abb.48 :



BOHLMANN und Mitarb. [46] isolierten 1966 aus Echinacea-Arten ebenfalls ein Dodecatetraensäure-isobutylamid. Die Stereochemie der Doppelbindungen konnte damals jedoch nicht geklärt werden.

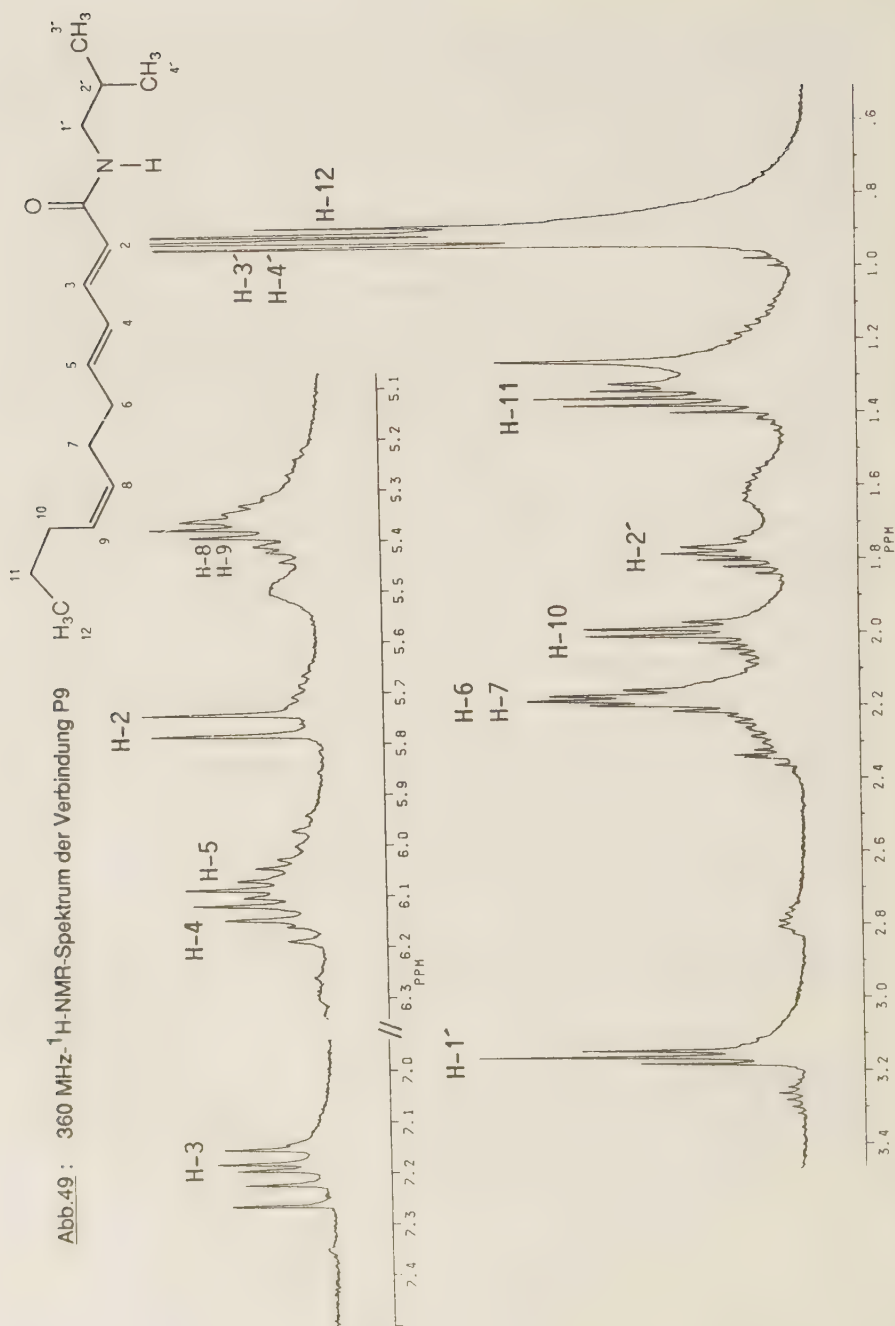
3.3.1.6. P9 : Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid

Die Verbindung P9 erwies sich bei den chromatographischen Voruntersuchungen als etwas lipophiler als P7. Im EI-Massenspektrum von P9 war neben den charakteristischen Fragmentierungen einer Isobutylamidgruppe ein Molekülpeak bei m/z 249 zu erkennen, was auf eine Summenformel von $C_{16}H_{27}NO$ schließen ließ. Aufgrund dieser Befunde war zu vermuten, daß Verbindung P9 ein Dihydroderivat von P7 darstellte.

Das UV-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 259 nm bewies das Vorliegen einer 2,4-Dienamid-Struktur. Infolgedessen mußte die Doppelbindung an C-8 oder C-10 hydriert sein.

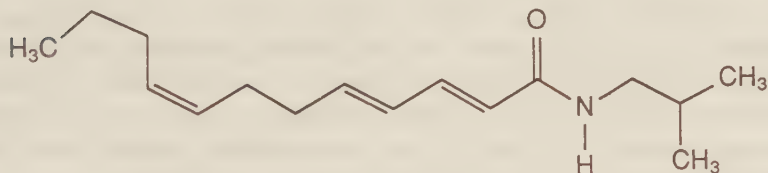
Das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum (Abb.49) zeigte im olefinischen Bereich die charakteristischen vier Signalgruppen der Protonen H-2 bis H-5, wobei die Kopplungskonstanten eine 2E,4E-Konfiguration erkennen ließen. Daneben war bei 5,35 ppm ein Multipllett für zwei Protonen vorhanden, das von den Protonen der isolierten Doppelbindung stammte. Aufgrund der Tripllett-Struktur des Signals bei 0,90 ppm der endständigen Methylgruppe mußte eine Methylengruppe benachbart sein, weswegen eine Doppelbindung in 10-Stellung ausschied. Folglich sollte die Doppelbindung in 8-Stellung vorliegen, was durch Spinentkopplungsexperimente bestätigt werden sollte.

Die Einstrahlung in den Frequenzbereich des Multipletts bei 2,18 ppm, welches von den beiden Methylengruppen C-6 und C-7 stammte, rief neben einer Vereinfachung des Dublett-Tripletts von H-4 zu einem Dublett ($J=11$ Hz) eine Spinentkopplung von H-8 hervor, wodurch dessen Signal sich ebenfalls zu einem Dublett umwandelte. Die Kopplungskonstante von 11 Hz ließ die Z-Konfiguration der isolierten Doppelbindung erkennen. Die Spinentkopplung des Tripletts der endständigen Methylgruppe veränderte das Signal von H-11 bei 1,37 ppm zu einem Tripllett.



Damit war die Struktur von P9 als Dodeca-2E,4E-8Z-triensäure-isobutylamid abgesichert (Abb.50). Über das Vorkommen dieses Alkylamids wurde in der Literatur bisher noch nicht berichtet.

Abb.50 : Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid (Verb.P9)



3.3.1.7. P4 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid

Anhand des UV-Spektrums ($\lambda_{\max} = 261 \text{ nm}$) war Verbindung P4 eine 2,4-Dienamid-Struktur zuzuordnen. Ein deutlicher Peak bei 2220 cm^{-1} im IR-Spektrum legte eine terminale Anordnung $\text{H-C}\equiv\text{C-}$ nahe.

Der Molekülpeak bei m/z 243 im EI-Massenspektrum ließ zunächst vermuten, daß es sich bei P4 um ein Stereoisomeres zu P3 handeln könnte. Es fehlten jedoch die typischen Fragmentierungen der Isobutylamidgruppe im Massenspektrum, was dafür sprach, daß der Aminanteil von P4 sich von den vorher besprochenen Isobutylamiden unterscheiden mußte.

Ein $500 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb.52) bestätigte diese Annahme. Die Signale des Säurerestes waren identisch mit denen der Verbindung P1, so daß ein Amid der Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure vorlag. Die Signale der Amingruppe zeigten jedoch ein vollkommen verändertes Bild.

Bei 3,23 ppm waren anstelle des Dublett-Dubletts nun zwei symmetrische Multipletts zu sehen, die für je ein Proton integrierten. Für das bisherige Multiplett bei 1,80 ppm waren jetzt drei Multipletts für je ein Proton bei 1,17, 1,41 und 1,58 ppm

vorhanden. Die Signale der beiden terminalen Methylgruppen bei 0,92 ppm erschienen als Dublett bzw. Triplett.

Aufgrund der aus dem Massenspektrum abgeleiteten Summenformel von $C_{16}H_{21}NO$ mußte der Aminrest gegenüber dem Isobutylaminrest eine zusätzliche Methylengruppe besitzen.

Eine Aufspaltung der Resonanzsignale geminaler Protonen wie im vorliegenden Spektrum ist nur in Ringsystemen oder beim Vorliegen benachbarter asymmetrischer C-Atome bekannt. Durch Einfügen einer Methylengruppe zwischen C-2' und C-3' würde C-2' eine asymmetrische Substitution aufweisen, wodurch die benachbarten geminalen Protonen an C-1' und C-3' nicht mehr magnetisch äquivalent wären. Damit wird auch die Signalstruktur der endständigen Methylgruppen verständlich.

Der Aminanteil von P4 sollte folglich ein 2-Methyl-butylamin sein. Dieser Aminrest ist in Alkylamiden äußerst selten anzutreffen. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten des Aminanteils von P4 mit Literaturangaben [93] zeigte eine völlige Übereinstimmung, wodurch die Identifizierung von Verbindung P4 als Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Abb.51) abgesichert war. Diese Verbindung wurde bereits früher aus *Acmella ciliata* (H.B.K.) CASS. [94] isoliert. Über ihr Vorkommen in Echinacea-Arten wurde bisher noch nicht berichtet.

Abb.51 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid (Verb. P4)

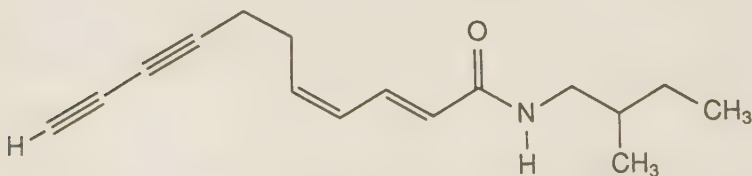
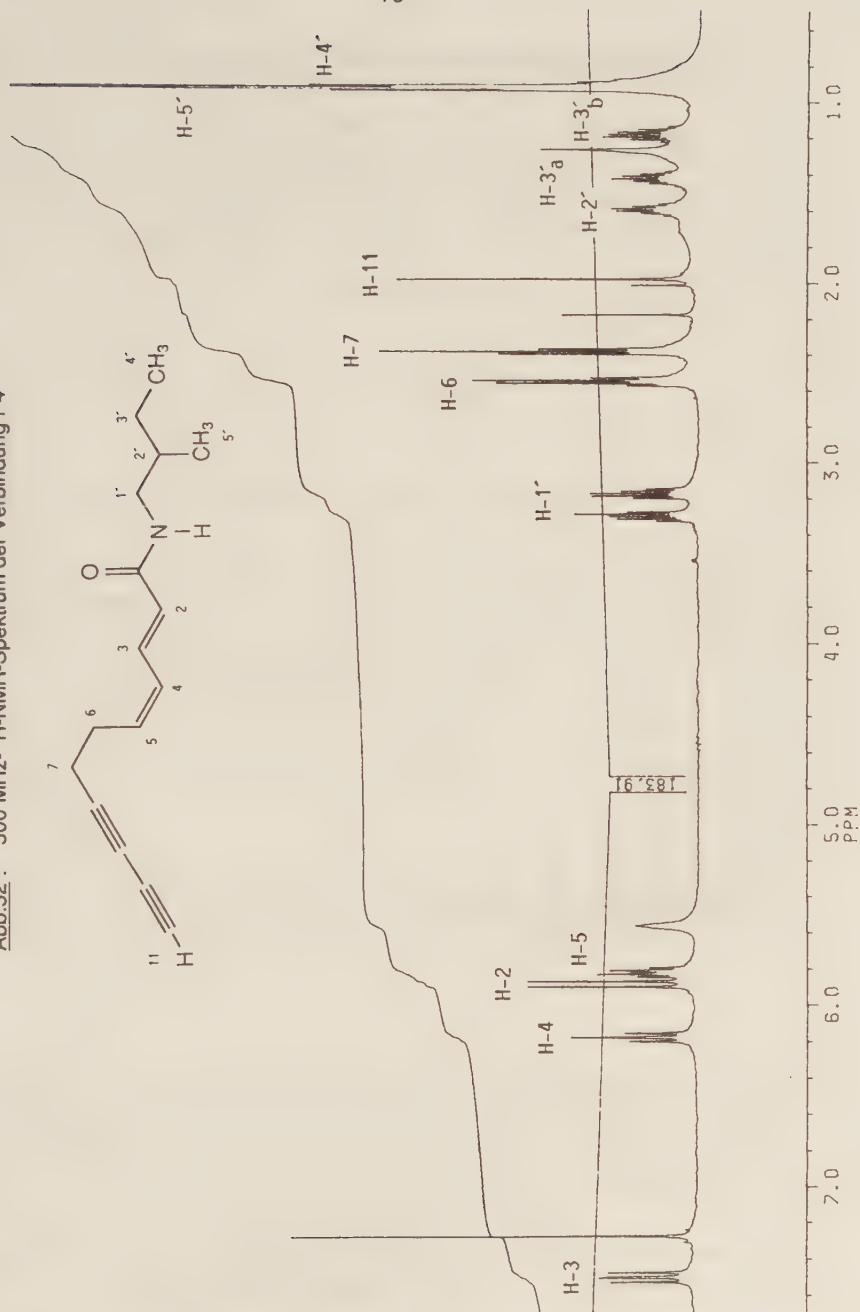
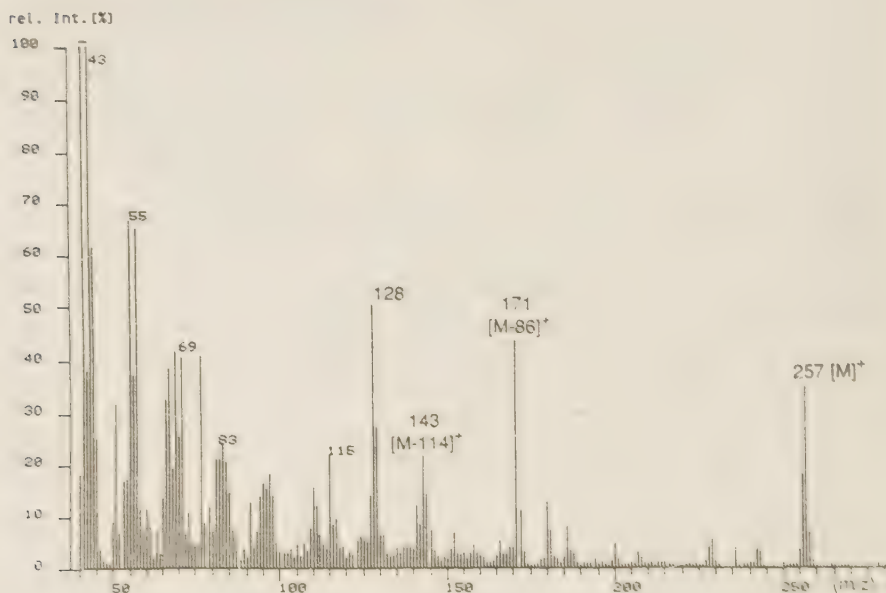


Abb. 52 : 500 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung P4

3.3.1.8. P5 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid

Die Strukturaufklärung der Verbindung P5 erfolgte analog zu dem vorher besprochenen Amid P4. Das EI-Massenspektrum (M^+ 257; $C_{17}H_{23}NO$) (Abb.53) zeigte wiederum keine Isobutylaminabspaltungen, sondern intensive Fragmente bei m/z 171 ($M^+ - 86$) und m/z 143 ($M^+ - 114$), die auf das Vorliegen eines 2-Methyl-butylamides deuteten.

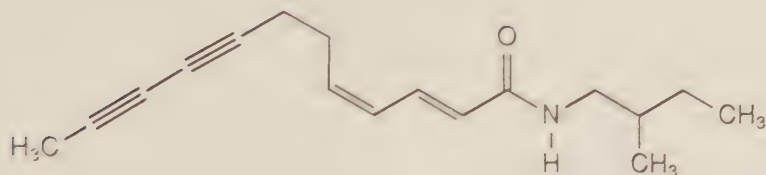
Abb.53 : EI-Massenspektrum der Verbindung P5



Im 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum von P5 war gegenüber dem Spektrum von P4 lediglich das Signal bei 1,90 ppm mit einer Integration für drei Protonen verschieden. P5 mußte also das Methylderivat von P4 sein, was mit der vorher ermittelten Summenformel übereinstimmte.

Die Struktur von P5 konnte somit als das bisher noch nicht beschriebene Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid (Abb.54) aufgeklärt werden.

Abb. 54 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid (Verb. P5)



3.3.1.9. P2 : Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid

Der Verbindung P2 war aufgrund des UV-Spektrums ($\lambda_{\max} = 211 \text{ nm}$) (Abb.55) ein anderer Strukturtyp zuzuordnen als den bisher untersuchten Verbindungen. Das IR-Spektrum (Abb.56) bewies jedoch wiederum das Vorliegen eines Alkylamides. Auffällig war neben zwei ausgeprägten Acetylenbanden bei 2220 und 2300 cm^{-1} ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-$) die Lage der olefinischen Bande bei 980 cm^{-1} , welche eine Verschiebung zu niedrigerer Frequenz erfahren hatte. Nach GREGER [92] ist dies auf eine Konjugation der Carbonylgruppe mit nur einer Doppelbindung zurückzuführen, wonach ein 2-Monoenamid vorliegen sollte.

Abb.55 : UV-Spektrum der Verbindung P2

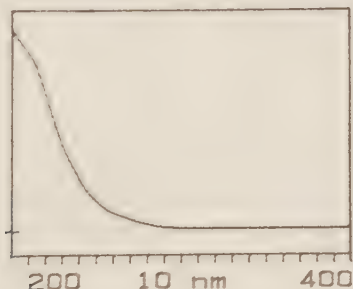
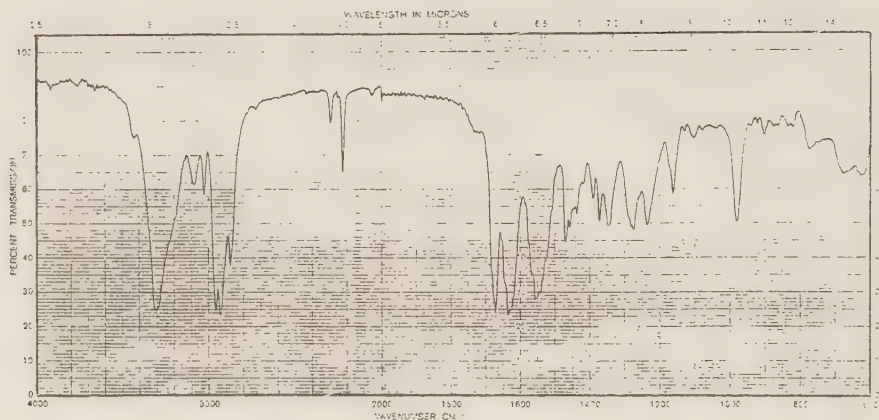


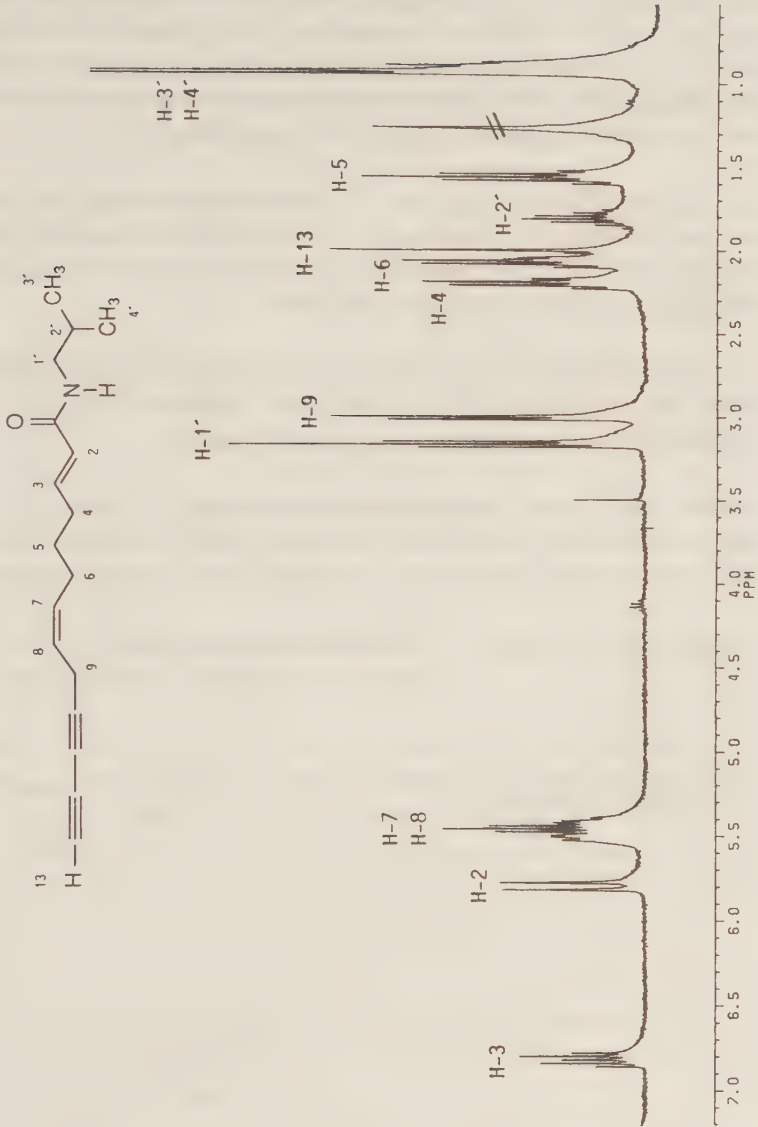
Abb.56 : IR-Spektrum der Verbindung P2



Das EI-Massenspektrum mit einem Molekülpeak bei m/z 257 ($C_{17}H_{23}NO$) ließ in der Fragmentierung einen Isobutylaminrest erkennen.

Das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum von Verbindung P2 (Abb.57) machte deutlich, daß der Säureanteil eine von den bisherigen Säureresten abweichende Struktur besitzen mußte. Der olefinische Bereich zeigte drei Signalgruppen für insgesamt vier Protonen. Das Dublett bei 5,79 ppm ($J=15$ Hz) konnte nur von H-2 stammen, während das Dublett-Triplett bei 6,81 ppm ($J=15;7$ Hz) der Resonanz des Protons H-3 entsprach. Das Multipllett bei 5,45 ppm war den beiden Protonen einer isolierten Doppelbindung zuzuordnen. Während die E-Konfiguration der Doppelbindung in 2-Stellung sofort aus den Kopplungskonstanten (15 Hz) abgeleitet werden konnte, war die Konfiguration der isolierten Doppelbindung aufgrund der Überlagerung der Signale zunächst nicht ablesbar.

Im aliphatischen Bereich des Spektrums war besonders ein Dublett für zwei Protonen einer Methylengruppe bei 3,00 ppm ($J=6$ Hz) auffällig. Die Einstrahlung in den Frequenzbereich dieses Signals führte zu einer Vereinfachung der rechten Hälfte des Multiplletts bei 5,45 ppm zu einem Dublett. Folglich mußte die Methylengruppe zu der isolierten Doppelbindung benachbart sein. Aus der nun ablesbaren Kopplungskonstante (11 Hz) des entstehenden Dubletts konnte der zweiten Doppelbindung eine Z-Konfiguration zugeordnet werden.

Abb.57 : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung P2

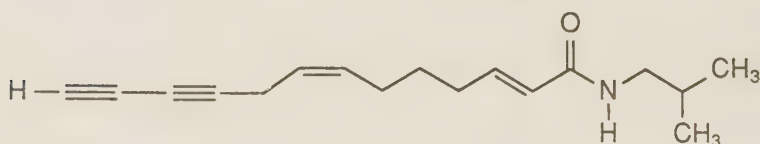
Die starke Tieffeldverschiebung des Signals der Methylengruppe nach 3,00 ppm mußte jedoch noch einen anderen Grund besitzen. Als zweiten Effekt der obigen Einstrahlung beobachteten wir eine Schärfung des Singulett-Signals bei 1,97 ppm. Dieses Signal, das von dem endständigen acetylenischen Proton stammte, besaß offensichtlich eine long-range-Kopplung zu der Methylengruppe, die nun aufgrund der Spinentkopplung wegfiel. Infolgedessen mußte die Methylengruppe auch eine oder zwei konjugierte acetylenische Bindungen in direkter Nachbarschaft besitzen.

Die Auswertung der anderen Signale im aliphatischen Bereich zeigte, daß P2 neben der oben erwähnten Methylengruppe noch Signale dreier weiterer Methylengruppen bei 2,19, 2,06 und 1,55 ppm aufwies, wovon zwei aufgrund der chemischen Verschiebung einem ungesättigten System benachbart waren.

Die Spinentkopplung des Signals bei 2,06 ppm rief einerseits eine Vereinfachung der linken Hälfte des Multipletts bei 5,45 ppm hervor, andererseits wurde das Multiplett der Methylengruppe bei 1,55 ppm zu einem Triplett entkoppelt.

Aufgrund dieser Protonensequenz konnte die Verbindung P2 eindeutig als Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid identifiziert werden (Abb.58). Diese Verbindung wurde bereits von BOHLMANN und Mitarb. [47] aus Echinacea-Arten isoliert.

Abb.58 : Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid (Verb. P2)

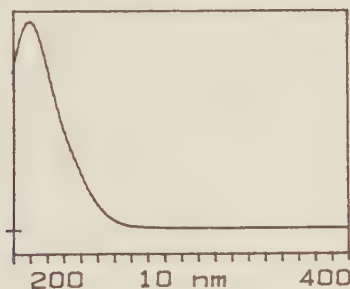


3.3.2. Alkylamide aus Echinaceae angustifoliae radix

3.3.2.1. A1 : Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid

Die Struktur der Verbindung A1 konnte durch das UV-Spektrum ($\lambda_{\max} = 211 \text{ nm}$) (Abb.59) und durch das IR-Spektrum (Bande bei 980 cm^{-1}) als Alkylamid vom 2-Monoenamid-Typ charakterisiert werden.

Abb.59 : UV-Spektrum der Verbindung A1



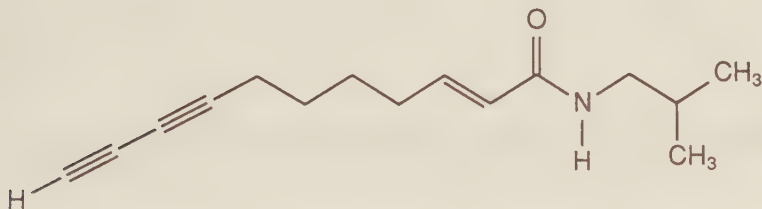
Die Auswertung des EI-Massenspektrums ($M^+ 231$; $C_{15}H_{21}NO$) wies durch die Fragmentierungen auf das Vorliegen eines Isobutylamides hin.

Im $80 \text{ MHz-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb.60) waren neben den typischen Signalen der Isobutylamingruppe im olefinischen Bereich nur die beiden Signale der Protonen H-2 und H-3 vorhanden. Das Dublett von H-2 bei $5,79 \text{ ppm}$ ($J=15 \text{ Hz}$) wies dabei eine Triplet-Unterstruktur auf, die durch eine Allylkopplung zu der Methylengruppe H-4 zustande kam. Das Signal des endständigen acetylenischen Protons bei $1,98 \text{ ppm}$ zeigte ebenfalls eine Allylkopplung zu einer Methylengruppe.

Im aliphatischen Bereich waren zwei Multipletts für je vier Protonen bei $1,60$ und $2,30 \text{ ppm}$ zu erkennen. Folglich mußten sich zwischen den beiden ungesättigten Systemen vier Methylengruppen befinden, wobei die beiden mittleren erwartungsgemäß im höheren Feld zur Resonanz kamen.

Entsprechend dieser Daten wurde die Struktur von Verbindung A1 als Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Abb.61) aufgeklärt. Es stellt das in 3,4-Stellung hydrierte Derivat zur Verbindung P1 aus *E. purpurea* dar. Die Substanz ist in Echinacea-Arten noch nicht beschrieben worden, wurde jedoch bereits aus *Acmella ciliata* (H.B.K.) CASS. [94] isoliert.

Abb.61 : Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A1)



3.3.2.2. A7 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid

Die UV-, IR- und Massenspektren der Verbindungen A7 und A1 waren identisch. Es sollte sich deshalb hier wieder um isomere Verbindungen handeln. Das häufige Vorkommen solcher stereoisomeren Alkylamide innerhalb einer Pflanze konnte bereits im vorigen Kapitel 3.3.1. gezeigt werden. Die einzige Möglichkeit einer Stereoisomerie bestand im vorliegenden Fall in der Konfiguration der Doppelbindung in 2-Stellung.

Das 80 MHz-¹H-NMR-Spektrum von A7 bestätigte diese Vermutung, da lediglich im olefinischen Bereich Unterschiede in den Signalen zu beobachten waren (Abb.63). Das Dublett-Triplett von H-3 erfuhr durch die Z-Anordnung der Doppelbindung eine Hochfeldverschiebung nach 5,79 ppm (J=11;7 Hz), während das Dublett von H-2 bei 5,70 ppm (J=11 Hz) auftrat.

Verbindung A7 stellte folglich das bisher noch nicht beschriebene Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Abb.62) dar.

Abb.62 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A7)

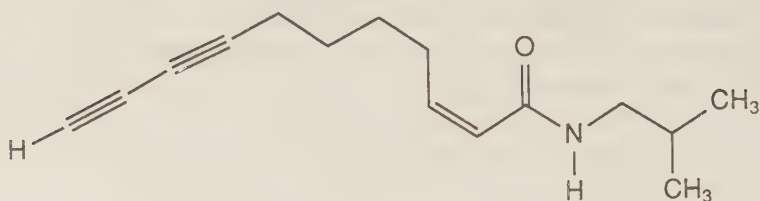
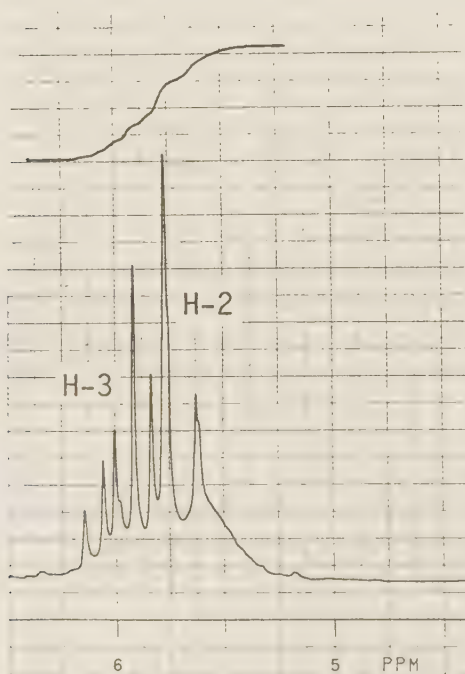


Abb.63 : 80 MHz-¹H-NMR-Spektrum der Verbindung A7 (Ausschnitt)



3.3.2.3. A2 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid

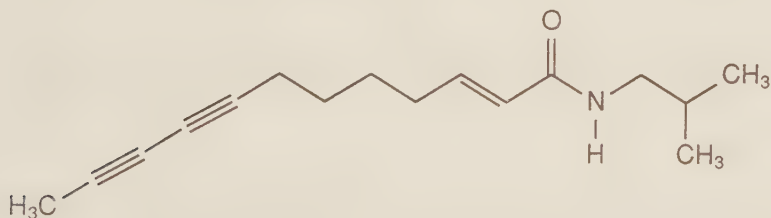
Analog zu den Verbindungen P1 und P3 in *E. purpurea* konnte auch in *E. angustifolia* das Methylderivat zu A1 aufgefunden werden.

Das EI-Massenspektrum von A2 besaß einen um 14 Masseneinheiten höheren Molekülpeak (M^+ 245) als A1, während die UV- und IR-Spektren weitgehend übereinstimmten.

Das ^1H -NMR-Spektrum von A2 entsprach dem von A1. Lediglich das Signal bei 1,90 ppm integrierte nun für drei Protonen, was beweisend für eine terminale Methylgruppe war.

Verbindung A2 konnte somit als das Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Abb. 64) identifiziert werden, welches in der Literatur noch nicht beschrieben war.

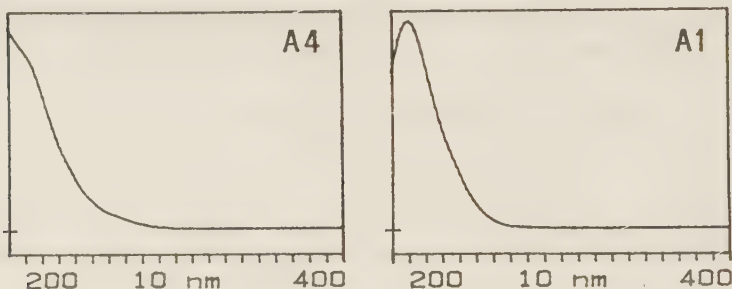
Abb.64 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A2)



3.3.2.4. A4 : Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid

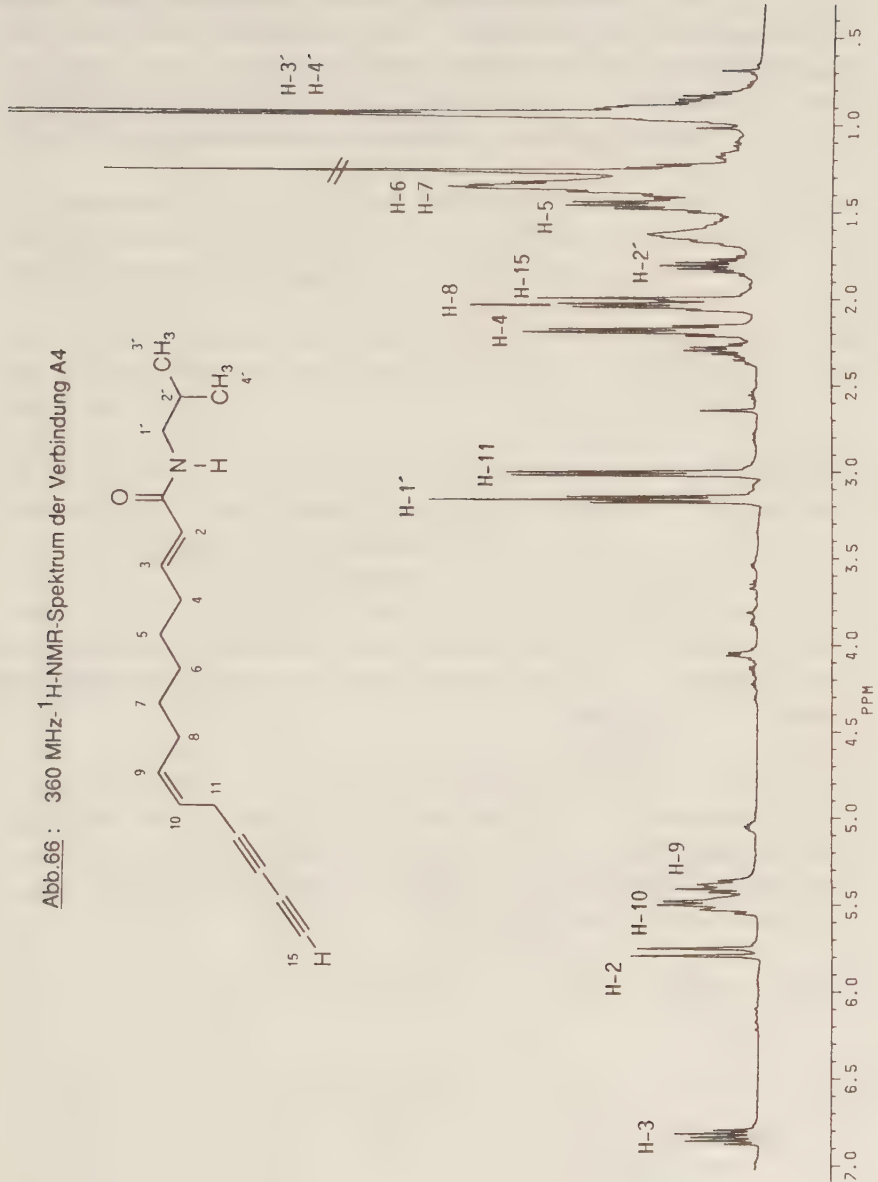
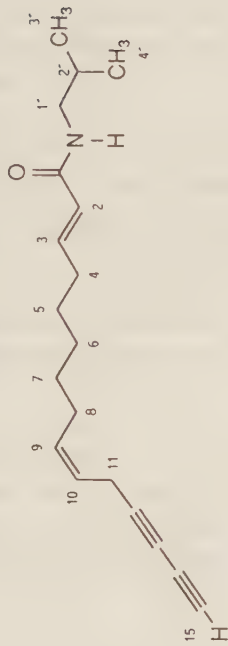
Das UV-Spektrum von Verbindung A4 (Abb.65) wies zwar ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 211 nm auf, zeigte aber einen etwas anderen Verlauf als das der Monoenamide A1, A2 und A7. Es entsprach dem der Verbindung P2 aus *Echinacea purpurea* (Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid) und zeigte von 210 bis 200 nm einen Absorptionsanstieg, während bei A1, A2 und A7 ein deutlicher Abfall zu erkennen war (Abb.65). Diese Erscheinung war bei P2 durch die zusätzliche Anwesenheit einer isolierten Doppelbindung zu erklären. Folglich war für A4 ein ähnlicher Chromophor zu erwarten.

Abb.65 : UV-Spektren der Verbindungen A4 und A1



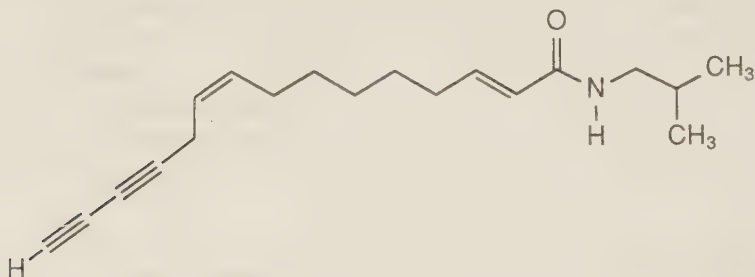
Das CI-Massenspektrum von A4 zeigte einen Pseudomolekülpeak $[M+H]^+$ bei m/z 286, was auf das relativ hohe Molekulargewicht von 285, entsprechend einer Summenformel $C_{19}H_{27}NO$, schließen ließ.

Die strukturelle Verwandtschaft von A4 und P2 wurde durch das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum bestätigt (Abb.66). Im aliphatischen Bereich von 1,3 bis 1,5 ppm war bei A4 ein vergrößertes Multiplett zu sehen, welches übereinstimmend mit der Summenformel durch die zusätzliche Anwesenheit zweier Methylengruppen verursacht wurde. Aufgrund der chemischen Verschiebung mußten sich diese innerhalb einer aliphatischen Kette befinden.

Abb. 66: 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A4

Die Struktur von Verbindung A4 ließ sich somit als Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Abb.67) festlegen. Dieses Isobutylamid wurde bereits früher von BOHLMANN und Mitarb. [47] aus Echinacea-Arten isoliert.

Abb.67 : Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verb. A4)

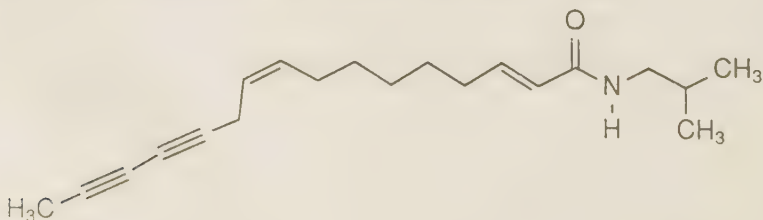


3.3.2.5. A5 : Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid

Auch Verbindung A5 sollte nach dem UV-Spektrum demselben Strukturtyp wie A4 und P2 angehören. Das CI-Massenspektrum ergab das ungewöhnlich hohe Molekulargewicht von 299 ($C_{20}H_{29}NO$).

Das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum ließ klar erkennen, daß es sich bei Verbindung A5 um das Methylderivat von A4 handeln mußte, da, wie schon in einigen Fällen vorher, das Signal bei 1,90 ppm eine Veränderung der Integralfäche (3H) erfahren hatte. Verbindung A5 stellte folglich das Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Abb.68) dar, welches bisher nicht bekannt war.

Abb.68 : Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verb. A5)



3.3.2.6. A9 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid

Wie in den Wurzeln von *E. purpurea* konnten auch in *E. angustifolia* neben den dominierenden Isobutylamiden in geringer Konzentration 2-Methyl-butylamide identifiziert werden.

Das Massenspektrum von A9 mit einem Molekülion bei m/z 245 zeigte die charakteristischen Fragmente einer 2-Methyl-butylamidgruppe, während solche eines Isobutylaminrestes fehlten.

Aus dem UV-Spektrum der Verbindung A9 ($\lambda_{\max} = 211$ nm) konnte die Struktur eines 2-Monoenamides abgeleitet werden, wobei keine weitere Doppelbindung im Molekül enthalten sein sollte.

Im 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von A9 (Abb.70) war erkennbar, daß der Säurerest mit dem von A7, einer Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure, identisch war. Daneben waren die typischen Signale des 2-Methyl-butylamin-Anteils vorhanden.

Verbindung A9 konnte somit die Struktur des Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamids (Abb.69) zugeordnet werden, welche bisher noch nicht in der Literatur beschrieben war.

Abb.69 : Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verb. A9)

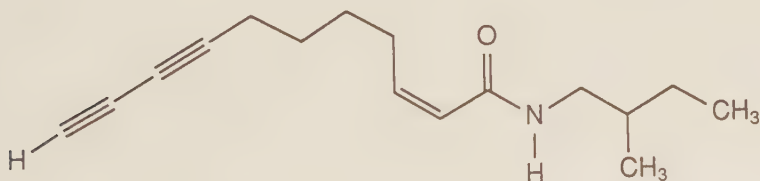
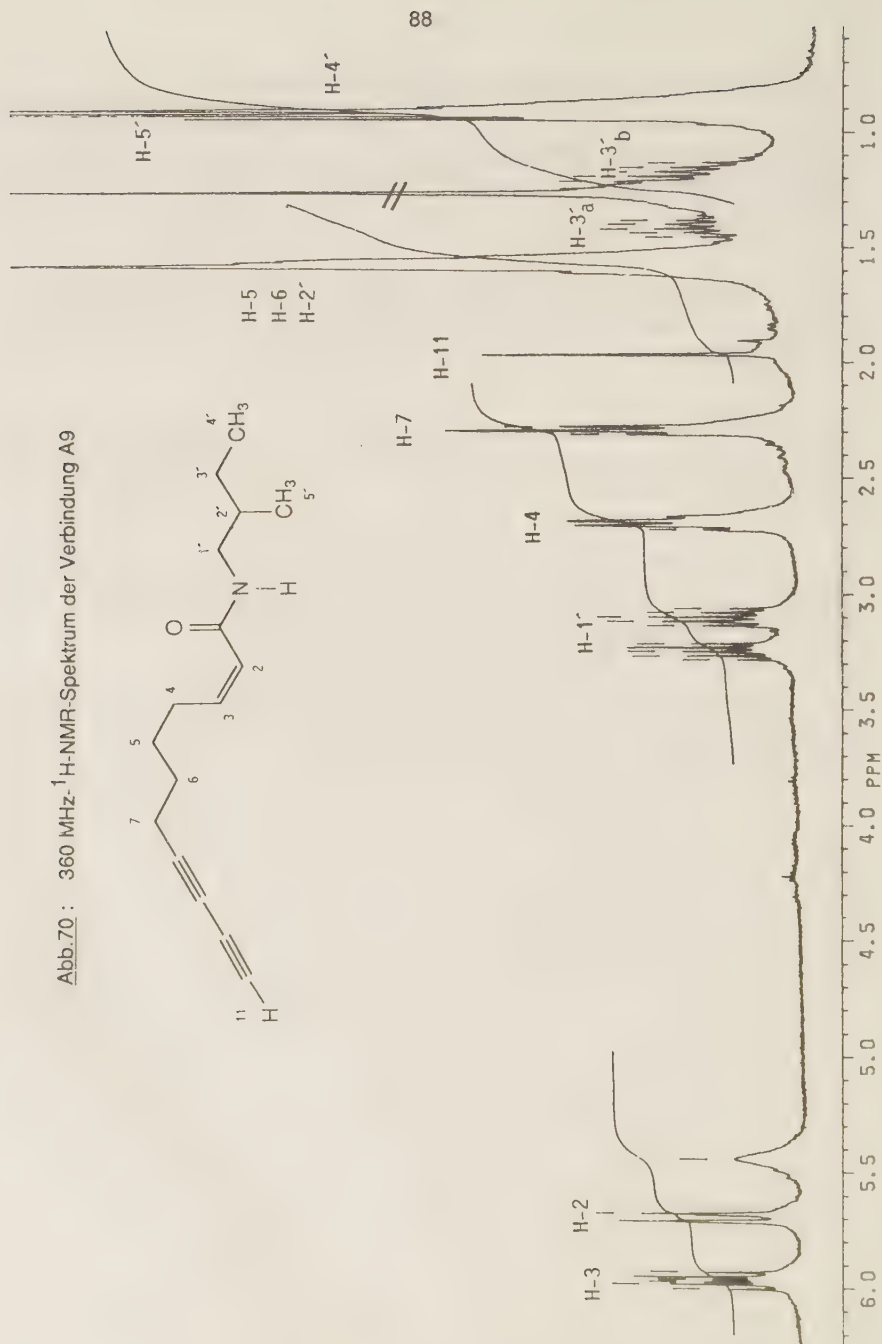
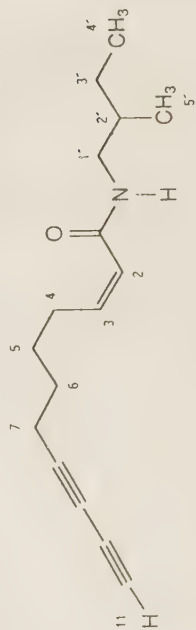


Abb.70 : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A9



3.3.2.7. A3 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid

Nach den UV-, IR- und Massenspektren konnte Verbindung A3 ebenfalls die Struktur eines Alkylamides vom 2-Methyl-butylamid-Typ zugeordnet werden. Das Molekülion von m/z 259 mit der dazugehörigen Summenformel $C_{17}H_{25}NO$ ließ vermuten, daß es sich bei A3 um das Methylderivat von A9 handeln könnte.

Das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum bestätigte durch das Signal bei 1,91 ppm (3H) die Methylierung an C-11. Gleichzeitig war zu erkennen, daß die Doppelbindung eine E-Konfiguration aufwies, was aus der Kopplungskonstante von 15 Hz und aus den chemischen Verschiebungen der Signale von H-2 und H-3 hervorging. Abbildung 72 verdeutlicht noch einmal die unterschiedlichen Signallagen von H-2 und H-3 bei 2E- und 2Z-orientierten Monoenamiden.

Verbindung A3 konnte folglich als das noch nicht beschriebene Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid (Abb.71) aufgeklärt werden.

Abb.71 : Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methyl-butylamid (Verb. A3)

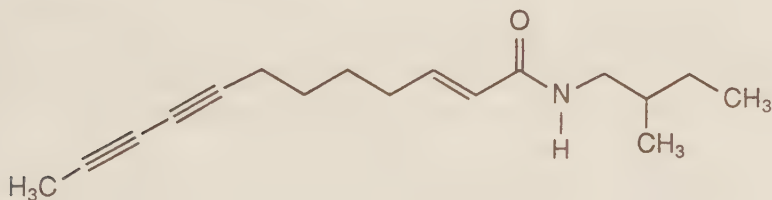
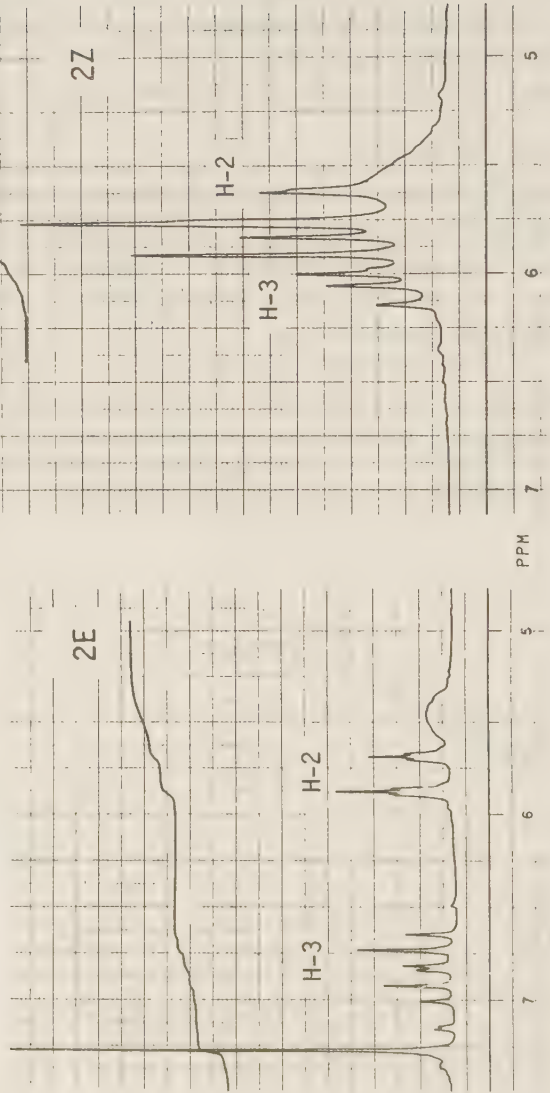


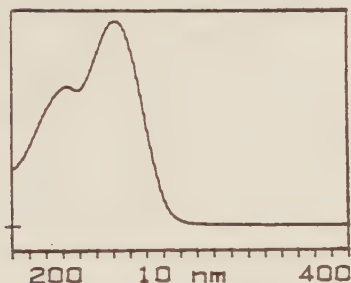
Abb. 72 : ^1H -NMR-Signallage der Protonen H-2 und H-3 bei 2E- und 2Z-orientierten Monoenalkylamiden



3.3.2.8. A6 : Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid

Aufgrund des Absorptionsmaximums bei 260 nm im UV-Spektrum (Abb.73) mußte es sich bei Verbindung A6 abweichend von den bisherigen Alkylamiden aus *Echinacea angustifolia* um ein 2,4-Dienamid handeln. Ein Nebenmaximum bei 231 nm ließ ein zusätzliches konjugiertes System vermuten.

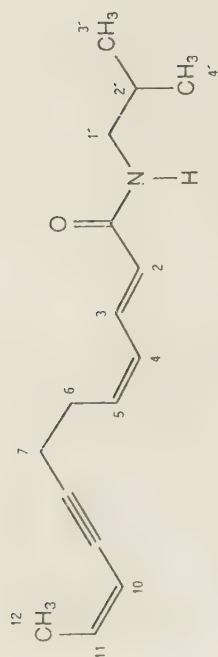
Abb.73 : UV-Spektrum von Verbindung A6



Im EI-Massenspektrum war ein Molekülpeak bei m/z 245 ($C_{16}H_{23}NO$) neben den typischen Abspaltungen einer Isobutylamidgruppe zu erkennen. Aufgrund dieser Daten war anzunehmen, daß Verbindung A6 ein Isomeres zu P8 aus *E. purpureae radix* darstellte. Dies konnte durch das 360 MHz- 1H -NMR-Spektrum (Abb.74) bestätigt werden.

Der aliphatische Bereich der Spektren von A6 und P8 war vollkommen identisch. Im olefinischen Bereich konnten bei A6 die Signale bei 5,87 ppm (d; $J=15$ Hz; H-2), 7,55 ppm (dd; $J=15$; 11 Hz; H-3) und 6,17 ppm (dd; $J=11$; 11 Hz; H-4) den Protonen H-2 bis H-4 zugeordnet werden, wobei die Kopplungskonstanten eine 2E,4Z-Konfiguration erkennen ließen.

Das Signal für H-5 bei 5,90 ppm war überlagert durch die Resonanz des olefinischen Protons H-11 (dq). Das Dublett bei 5,45 ppm ($J=11$ Hz; H-10) war stark strukturiert, was analog zu P8 durch eine Allylkopplung zur endständigen Methylgruppe zustande kam.



H-1'

Abb. 74(1) : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum
der Verbindung A6 (Ausschnitt)

H-12

H-6 H-7

H-2'

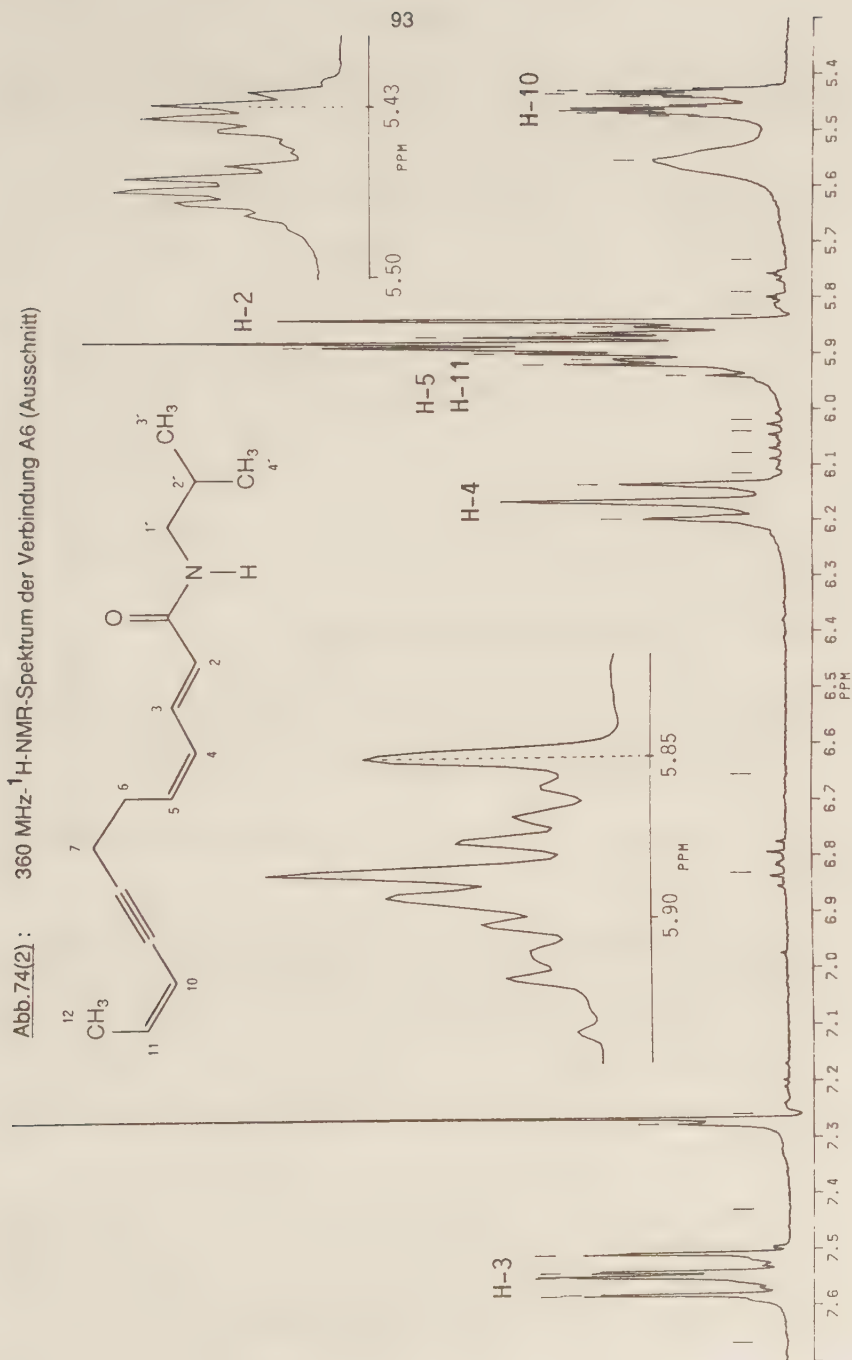
H-3'

H-4'

3.4 3.2 3.0 2.8 2.6 2.4 2.2 2.0 1.8 1.6 1.4 1.2 1.0 .8

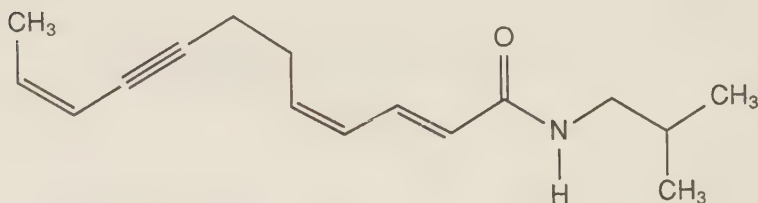
PPM

Abb. 74(2) : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A6 (Ausschnitt)



Verbindung A6 konnte somit als das neue Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid (Abb.75) charakterisiert werden.

Abb.75 : Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid (Verb. A6)



3.3.2.9. A10 : Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid

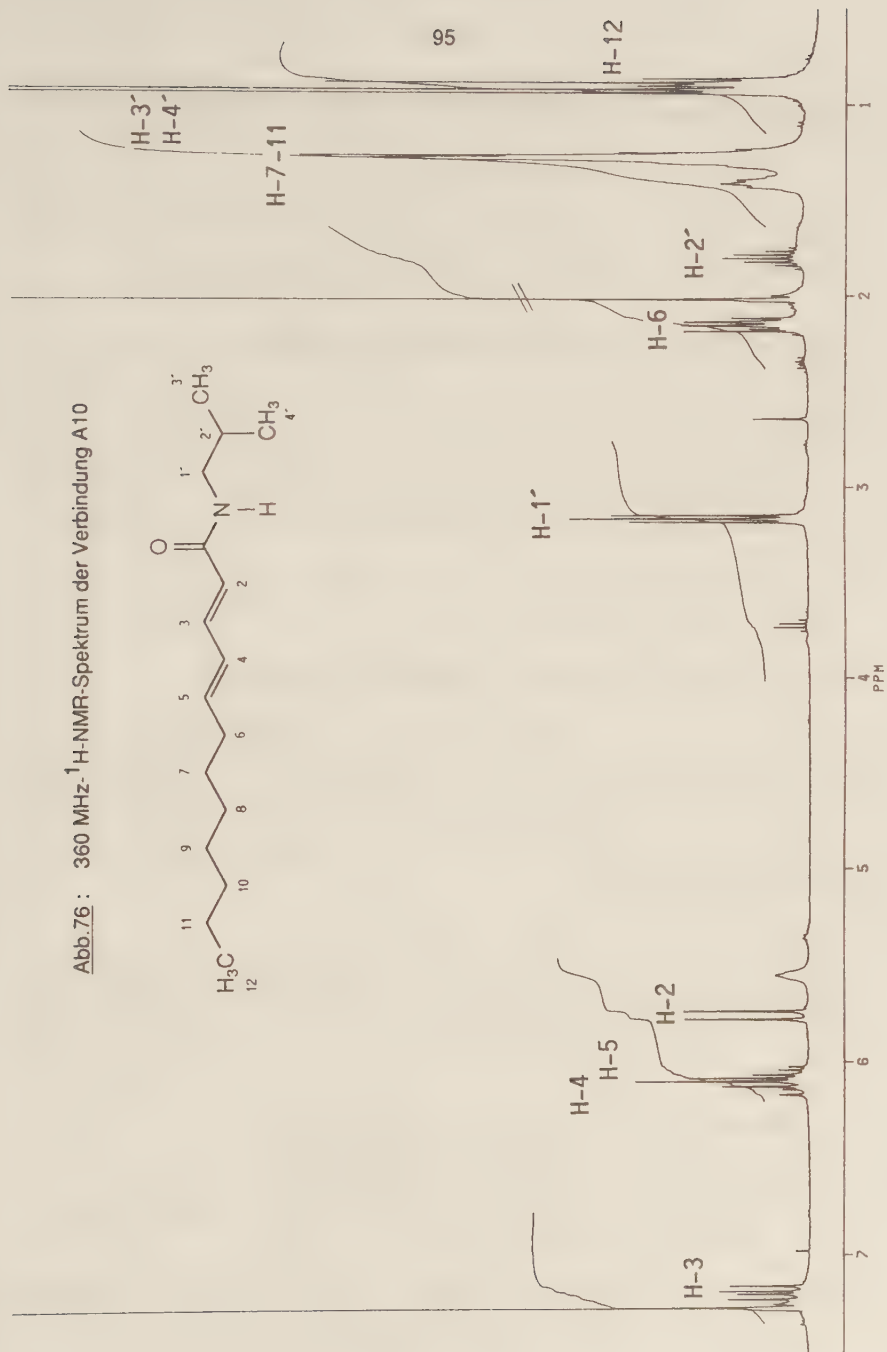
Das 2,4-Dienamid A10 (UV-Spektrum: $\lambda_{\max} = 260 \text{ nm}$) war sowohl in den Wurzeln von *E. purpurea* als auch in *E. angustifolia* vorhanden, wobei es sich bei den DC- und HPLC-Voruntersuchungen als das lipophilste aller Alkylamide auszeichnete.

Das EI-Massenspektrum ($M^+ 251$; $C_{16}H_{29}NO$) ließ das Vorliegen eines Isobutylamides erkennen.

Im 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum von A10 (Abb.76) waren im olefinischen Bereich nur die Signalgruppen der Protonen der 2,4-Doppelbindungen zu sehen. Während der Doppelbindung in 2-Stellung sofort eine E-Konfiguration zugeordnet werden konnte ($J = 15 \text{ Hz}$), mußte das Multipllett bei 6,10 ppm erst durch Spinentkopplung vereinfacht werden. Durch Einstrahlung in den Frequenzbereich des Signals von H-3 entstand ein Dublett ($J = 15 \text{ Hz}$) für H-4. Damit war die 2E,4E-Konfiguration von A10 abgesichert.

Im aliphatischen Bereich waren den Protonen des Säureanteils nur noch die Signale bei 2,14 ppm (dt; $J = 7,7 \text{ Hz}$; 2H; H-6), 1,26 ppm (m) und 0,88 ppm (t; $J = 7 \text{ Hz}$; 3H; H-12) zuzuordnen. Daraus folgte, daß sich an die beiden konjugierten Doppelbindungen in 2,4-Stellung eine gesättigte aliphatische Kette anschloß, die nach dem

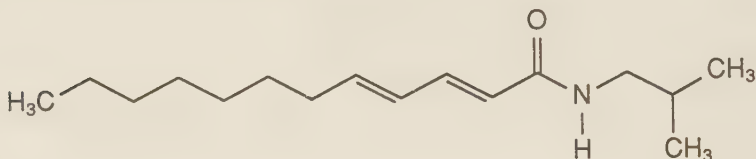
Abb. 76 : 360 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A10



Massenspektrum aus sechs Methylengruppen und der endständigen Methylgruppe bestand.

Verbindung A10 wurde folglich als Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid (Abb.77) identifiziert. Dieses Alkylamid wurde erstmals von DHAR und Mitarb. [95] aus Pfeffer-Arten isoliert und später auch in Echinacea-Arten nachgewiesen [89].

Abb.77 : Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid (Verb. A10)



3.3.2.10. Weitere Isobutylamide aus Echinaceae angustifoliae radix

Durch chromatographischen Vergleich sowie durch die online aufgenommenen UV-Spektren wurde Verbindung A8 aus *E. angustifoliae radix* als das Isomerengemisch der Isobutylamide der Dodeca-2E,4E,8Z,10E- und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraensäure identifiziert. A8 stellt die Hauptverbindung in der lipophilen Fraktion von *E. angustifoliae radix* dar.

Bei den nachfolgend beschriebenen Alkylamiden handelt es sich um Verbindungen, die bereits vorher von uns aus *E. purpureae radix* isoliert und aufgeklärt wurden (Kap. 3.3.1.) und die in geringer Menge auch in *E. angustifoliae radix* gefunden wurden:

- A11 : Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (=P1)
- A12 : Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (=P6)
- A13 : Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (=P3)
- A14 : Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid (=P2)

Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der UV-, MS- und ¹H-NMR-Spektren mit den Verbindungen aus *E. purpurea* sowie durch Co-Chromatographie.

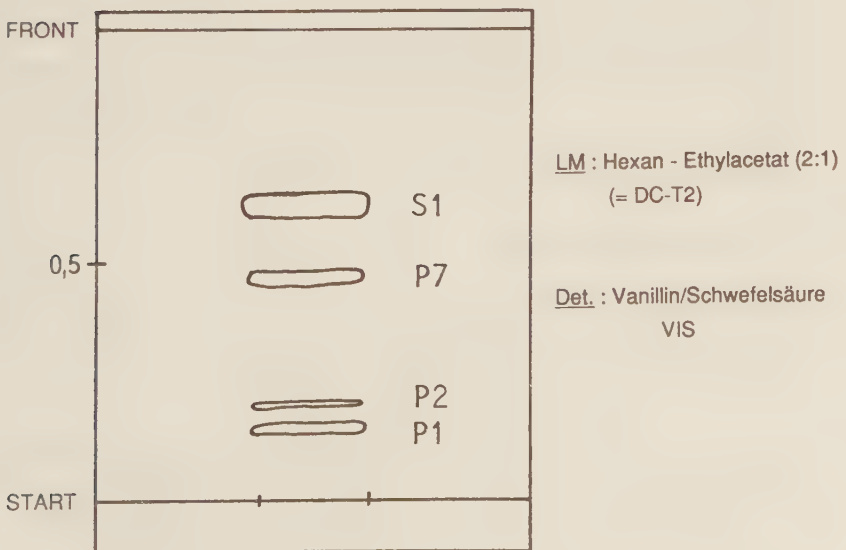
4. Isolierung und Strukturaufklärung eines Sesquiterpenalkohols aus dem frischen Kraut von *Echinacea purpurea*

4.1. Voruntersuchungen

4.1.1. Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung einer von uns aus den frischen, oberirdischen Teilen von *Echinacea purpurea* hergestellten homöopathischen Urinktur zeigte, daß im Bereich der lipophilen Verbindungen neben den Isobutylamiden eine zusätzliche Hauptverbindung auftrat (Abb.78). Diese mit S1 bezeichnete Zone färbte sich nach Detektion mit Vanillin/Schwefelsäure blau an und konnte nur in Extrakten aus frischer Herba-Droge nachgewiesen werden.

Abb.78 : Dünnschichtchromatogramm der Urinktur von *Echinacea purpurea* (nach HAB 1)



4.1.2. Hochleistungsflüssigchromatographie

Für die HPLC-Analyse der lipophilen Bestandteile der Urinktur von *E. purpurea* verwendeten wir ein RP-18-Gradientensystem von 40-80 % Acetonitril in 30 Minuten (=HPLC-T3).

In Abbildung 79 sind die durch Photodiodenarray-Detektion bei 210 nm und 254 nm gleichzeitig aufgenommenen HPLC-Chromatogramme der *Echinacea purpurea*-Urtinktur dargestellt.

Auch hier wurde deutlich, daß neben den Isobutylamiden P1, P2 und P7 ein zusätzlicher Hauptpeak bei 15,3 min auftrat. Er konnte im Gegensatz zu den Alkylamiden in der getrockneten Droge nicht aufgefunden werden.

4.2. Isolierung

4.2.1. Extraktbereitung

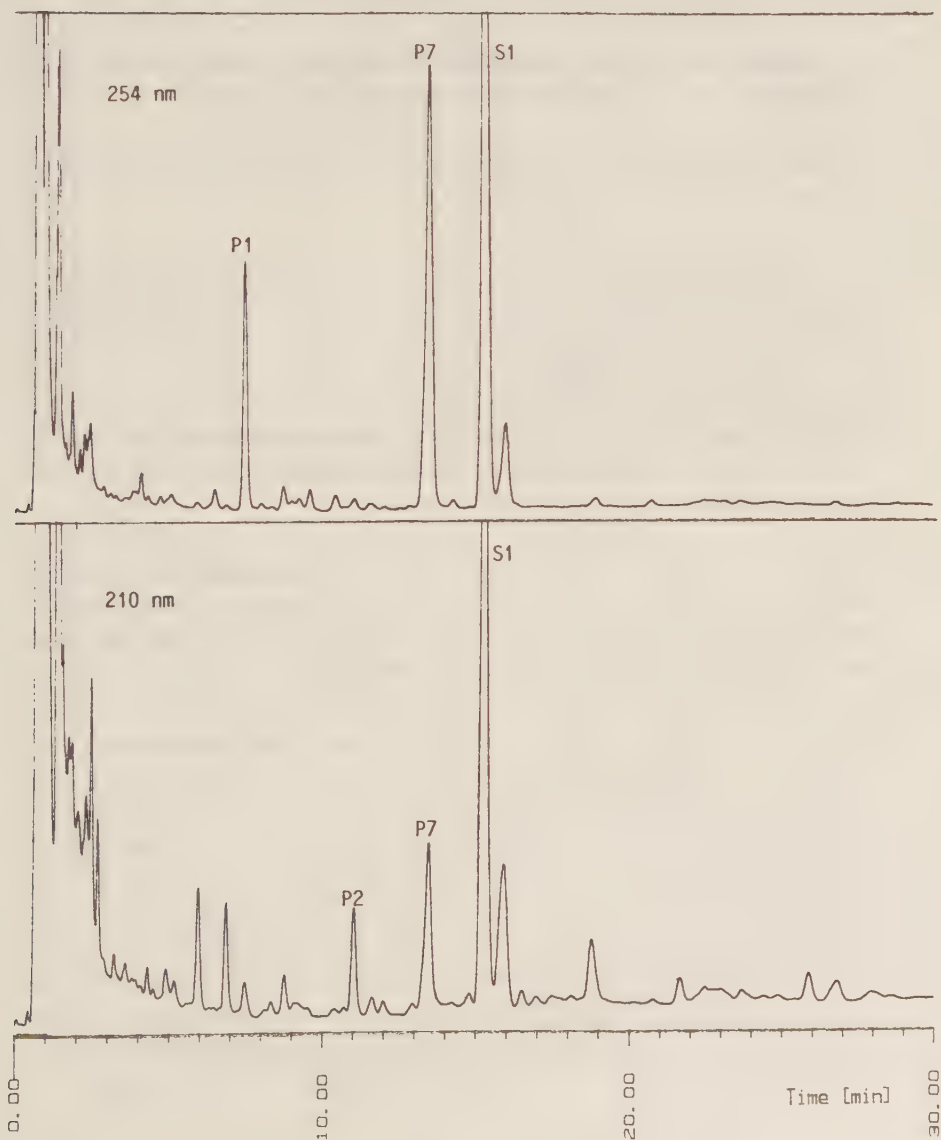
Entsprechend dem HAB 1 wurde aus den oberirdischen Teilen von *Echinacea purpurea* eine Urinktur hergestellt. Chlorophyll und phenolische Inhaltsstoffe wurden zur Anreicherung von S1 mit Bleiacetat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase enthielt die Verbindung S1 und andere lipophile Inhaltsstoffe in angereicherter Form.

4.2.2. Säulenchromatographie

Zur Fraktionierung des angereicherten Extraktes verwendeten wir die Säulenchromatographie auf Kieselgel. Als Elutionsmittel wählten wir Hexan-Ethylacetat 4:1. Die aufgefundenen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht.

Fraktionen, welche die Substanz S1 enthielten, waren nach ersten orientierenden massenspektroskopischen und NMR-Untersuchungen noch durch β -Sitosterin verunreinigt, das im Laufmittel der Säulenchromatographie exakt denselben Rf-Wert hatte wie Verbindung S1.

Abb.79 : HPLC-Chromatogramme der Urinktur von *Echinacea purpurea* bei 210 nm und 254 nm im Trennsystem HPLC-T3; **P1** = Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; **P2** = Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid; **P7** = Isomerengemisch der Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide



4.2.3. Semipräparative HPLC

Zur Abtrennung der Sterin-Verunreinigung wandten wir die semipräparative HPLC auf einer RP-18-Umkehrphase an. Als mobile Phase diente Acetonitril 55 % (isokratisch), wobei wir 240 nm als Detektionswellenlänge wählten.

Da β -Sitosterin eine erheblich längere Retentionszeit auf RP-Material aufwies als die Verbindung S1, ließen sich beide Substanzen gut voneinander trennen.

Auf diese Art konnten wir 40 mg Reinsubstanz von Verbindung S1 als farbloses Öl gewinnen.

4.3. Strukturaufklärung

4.3.1. UV- und IR-Spektroskopie

Das UV-Spektrum von S1 (Abb.80) wies ein Absorptionsmaximum bei 239 nm ($\epsilon = 18.300$; Hexan) auf und legte somit als Chromophor zwei konjugierte Doppelbindungen nahe, während eine Alkylamid-Struktur ausschied.

Aufgrund der Lage des Absorptionsmaximums sowie der Intensität der Absorption mußte das Dien-System in einer s-trans-Konformation vorliegen, da die entsprechenden rotationsgehinderten s-cis-Isomeren nach WILLIAMS und FLEMING [96] längerwelliger und mit geringerer Intensität absorbieren (Abb.81).

Abb.80 : UV-Spektrum von S1

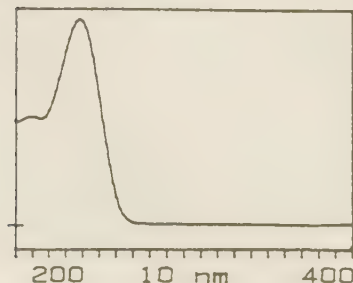
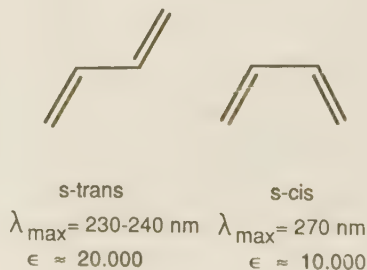
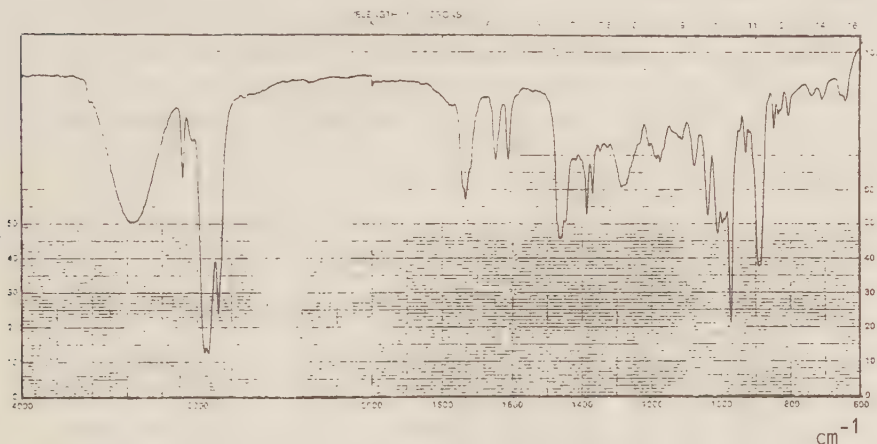


Abb.81 : s-trans- und s-cis-Konformation



Das IR-Spektrum (Abb.82) bestätigte das Vorliegen eines konjugierten Diens durch Banden bei 1640 , 1610 und 885 cm^{-1} . Ferner zeigte eine breite Bande bei 3350 cm^{-1} das Vorliegen einer oder mehrerer OH-Gruppen an.

Abb.82 : IR-Spektrum der Verbindung S1



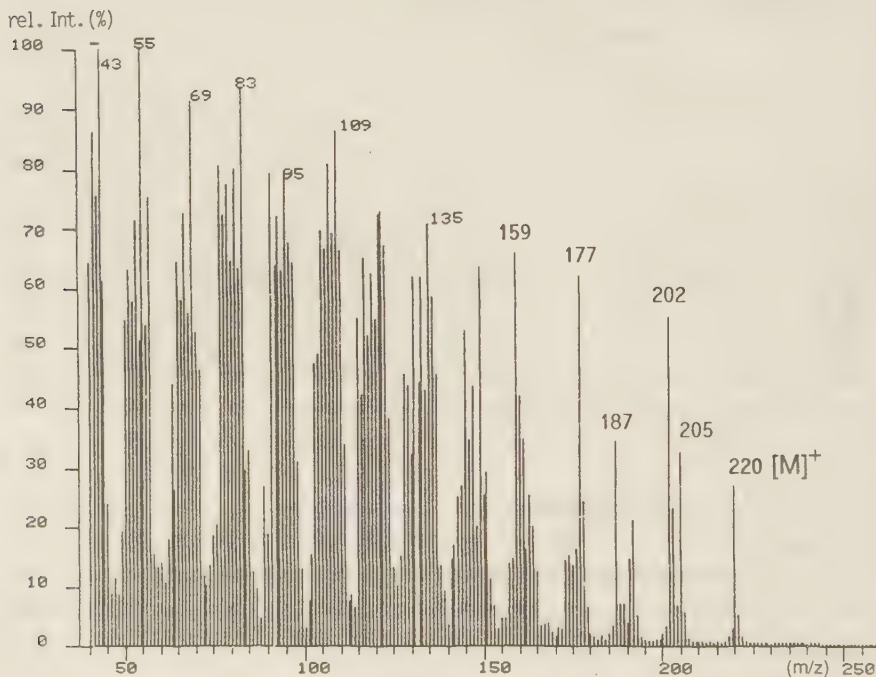
4.3.2. EI- und CI-Massenspektroskopie

Durch chemische Ionisation (NH_3) konnte ein Pseudomolekülion $[\text{M}+\text{H}]^+$ bei m/z 221 erhalten werden. Im Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrum (EI) (Abb.83) war entsprechend ein Molekülpeak bei m/z 220 sichtbar.

Im EI-Massenspektrum waren neben einem Peak bei m/z 205, der die Abspaltung einer Methylgruppe anzeigte, ein intensives Fragment bei m/z 202 auffallend. Dieses stammte formal aus einer Wasserabspaltung aus dem Molekül und war somit beweisend für das Vorliegen einer Hydroxylgruppe. Ein weiteres Fragment bei m/z 177 (Verlust von 43 Masseneinheiten) war nur durch die Abspaltung einer Propylgruppe C_3H_7^+ oder einer Methylketogruppe $\text{H}_3\text{C-CO}^+$ zu erklären. Zwei charakteristische Banden im IR-Spektrum bei 1380 und 1360 cm^{-1} sprachen für das Vorliegen einer Isopropylgruppe. Weitere MS-Peaks bei m/z 187 und 159 waren durch sukzessive Abspaltungen der obengenannten Fragmente erklärbar.

Die aus den Massenspektren abgeleitete Summenformel von $C_{15}H_{24}O$ ließ vermuten, daß es sich bei Verbindung S1 um ein Sesquiterpen handeln könnte, welches eine alkoholische OH-Gruppe enthält.

Abb.83 : EI-Massenspektrum der Verbindung S1



4.3.3. ^1H -NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme eines 500 MHz- und eines 300 MHz- ^1H -NMR-Spektrums (Abb.86) bestätigte das Vorliegen einer Sesquiterpenstruktur. Die Auswertung der Spektren lieferte folgende Ergebnisse:

- Die Integration der Signalfächen ergab 23 Protonen, was unter Einbeziehung der OH-Gruppe mit der zuvor ermittelten Summenformel übereinstimmte.

- Ein Dublett-Dublett bei 3,74 ppm (1H; J=12; 4 Hz) mußte entsprechend der chemischen Verschiebung vom geminalen Proton einer sekundären Hydroxylgruppe stammen.
- Im olefinischen Bereich waren vier charakteristische Singulett-Signale zu erkennen, die bei Vergrößerung eine Feinstrukturierung aufwiesen. Diese Singulets waren auf das Vorliegen zweier exozyklischer Doppelbindungen zurückzuführen. Ein Dublett bei 5,98 ppm (1H; J=16 Hz) und ein weiteres Dublett-Dublett bei 5,41 ppm (1H; J=16; 10 Hz) mußten dagegen von einer endozyklischen Doppelbindung stammen, die aufgrund der Kopplungskonstante von 16 Hz in einer trans-Konfiguration vorlag.
- Zwei Dublett-Signale bei 0,79 und 0,88 ppm (je 3H; J=7 Hz) sowie ein Multiplett bei 1,47 ppm (dq; 1H) bestätigten das aus dem Massenspektrum abgeleitete Vorliegen einer Isopropylgruppe.
- Der aliphatische Bereich von 1,66 bis 2,59 ppm lieferte ein sehr komplexes und teilweise überlagertes Signalmuster. Dies war darauf zurückzuführen, daß geminale Protonen in zyklischen Systemen magnetisch nicht äquivalent sind und somit unterschiedliche chemische Verschiebungen besitzen. Das Vorliegen eines zyklischen Sesquiterpens wurde dadurch zwar bestätigt, die Zuordnung der Signale im aliphatischen Bereich ließ sich jedoch mit den vorliegenden Spektren nicht vornehmen.

4.3.4. COSY-NMR-Spektroskopie

Um weitere Strukturinformationen zu erhalten, nahmen wir ein zweidimensionales homonukleares ^1H - ^1H -Korrelationsspektrum (COSY) von S1 bei 300 MHz auf (Abb.87).

Die Auswertung der Crosspeaks, die durch Spinkopplung der einzelnen Protonen hervorgerufen wurden, lieferte zwar Teilsequenzen der Struktur von S1, jedoch war im aliphatischen Bereich das Kopplungssystem nicht eindeutig zu interpretieren, da z.B. das Signal bei 1,66 ppm mit fünf anderen Signalen koppelte.

Somit war das COSY-NMR-Spektrum erst durch das Hinzufügen weiterer spektroskopischer Daten zu interpretieren.

4.3.5. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Im Protonen-breitband-entkoppelten 75 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung S1 (Abb.88) konnten zwei quartäre, sechs tertiäre, fünf sekundäre und zwei singuläre Kohlenstoffatome identifiziert werden.

Die Multiplizitäten der beobachteten Signale wurden durch eine DEPT-Pulssequenz bestimmt.

Beim DEPT-Experiment (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) werden durch eine geeignete Pulsfolge im ^1H - und ^{13}C -Frequenzbereich für CH -, CH_2 - oder CH_3 -Gruppen selektiv Signale mit negativer oder positiver Amplitude erzeugt, wodurch eine eindeutige Zuordnung der Multiplizitäten aller Signale möglich ist [97].

4.3.6. ^1H - ^{13}C -Korrelations-Spektroskopie

Das in Abbildung 89 dargestellte zweidimensionale heteronuklear ^1H - ^{13}C -korrelierte NMR-Spektrum von S1 ermöglichte die wechselseitige Zuordnung der ^{13}C - und ^1H -Resonanzsignale.

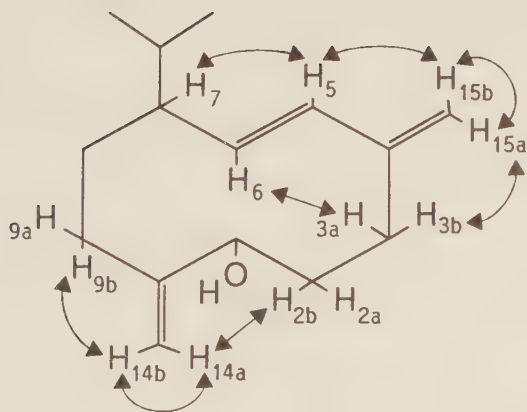
Diese heteronukleare Korrelation zeigte besonders deutlich die magnetisch nicht äquivalenten geminalen Protonen an, da diese auf der Senkrechten einer ^{13}C -Linie mehrere Crosspunkte verursachten.

4.3.7. NOE-Experimente

Abschließende NOE-Experimente lieferten Aussagen über räumlich benachbarte Protonen. In Tab.3 sind die beobachteten Effekte aufgelistet.

Tab.3 : NOE-Daten der Verbindung S1

Einstrahlung	beobachteter NOE
H _{15b}	H _{15a} , H ₅
H _{15a}	H _{15b} , H _{3b}
H _{14b}	H _{14a} , H _{9b}
H _{14a}	H _{14b} , H _{2b}
H ₆	H _{3a}
H ₅	H _{15b} , H ₇



Aus allen vorliegenden spektroskopischen Daten wurde für S1 die nachfolgende Struktur abgeleitet (Abb.84):

Abb.84 : Verbindung S1

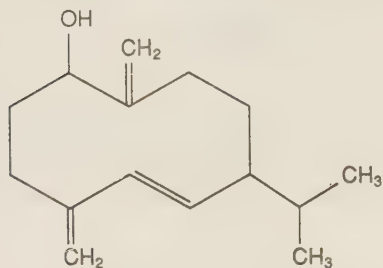
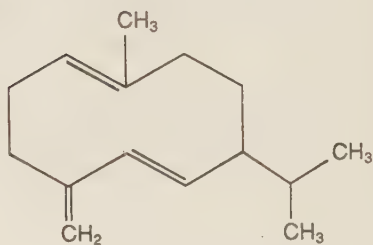


Abb.85 : Germacren D



S1 stellt demnach einen Sesquiterpenalkohol vom Germacren-Typ dar, das Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1-ol. Germacren D, eine eng verwandte Verbindung (Abb.85), wurde kürzlich aus dem Kraut von *Echinacea purpurea* isoliert [47] und auch im ätherischen Öl der drei *Echinacea*-Arten nachgewiesen [60].

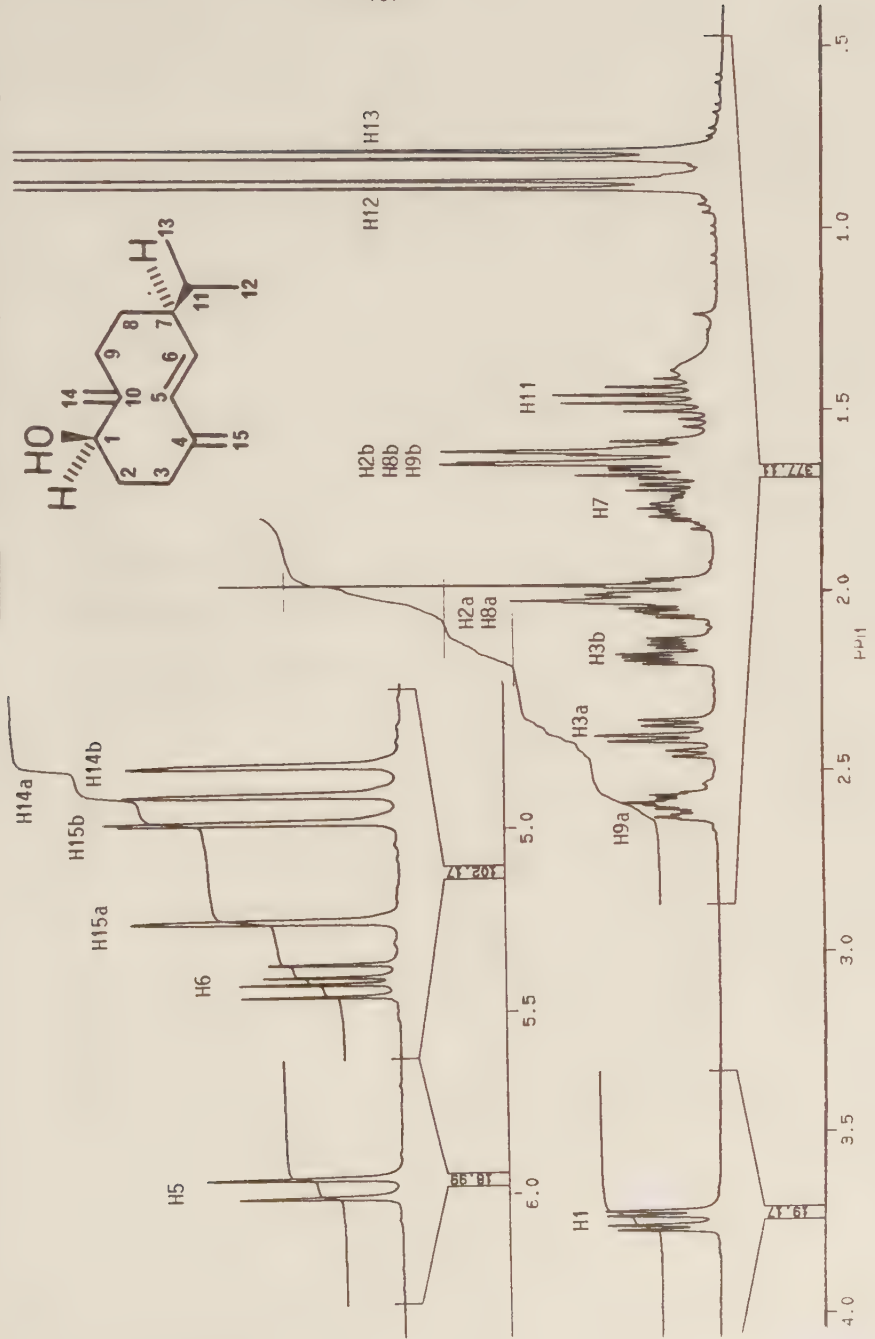
Abb. 86: 300 MHz- ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung S1

Abb.87 : 300 MHz-COSY-Spektrum der Verbindung S1

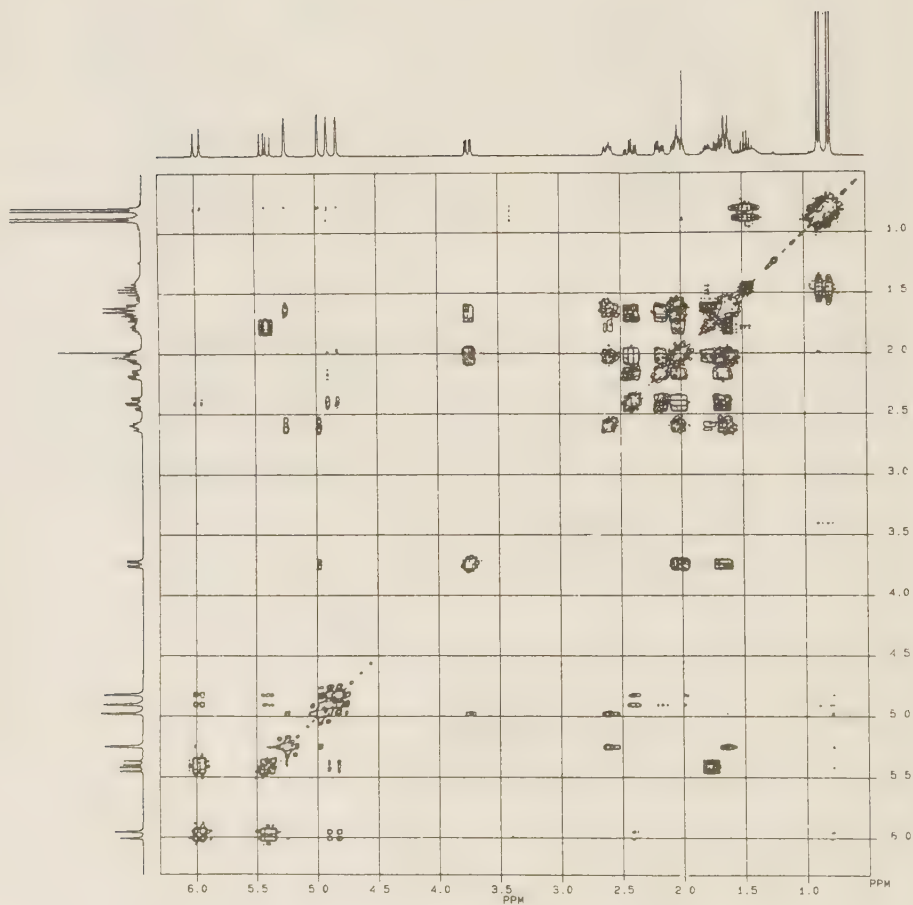


Abb.88 : 75 MHz- ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung S1 (protonen-breitbandenkoppelt)

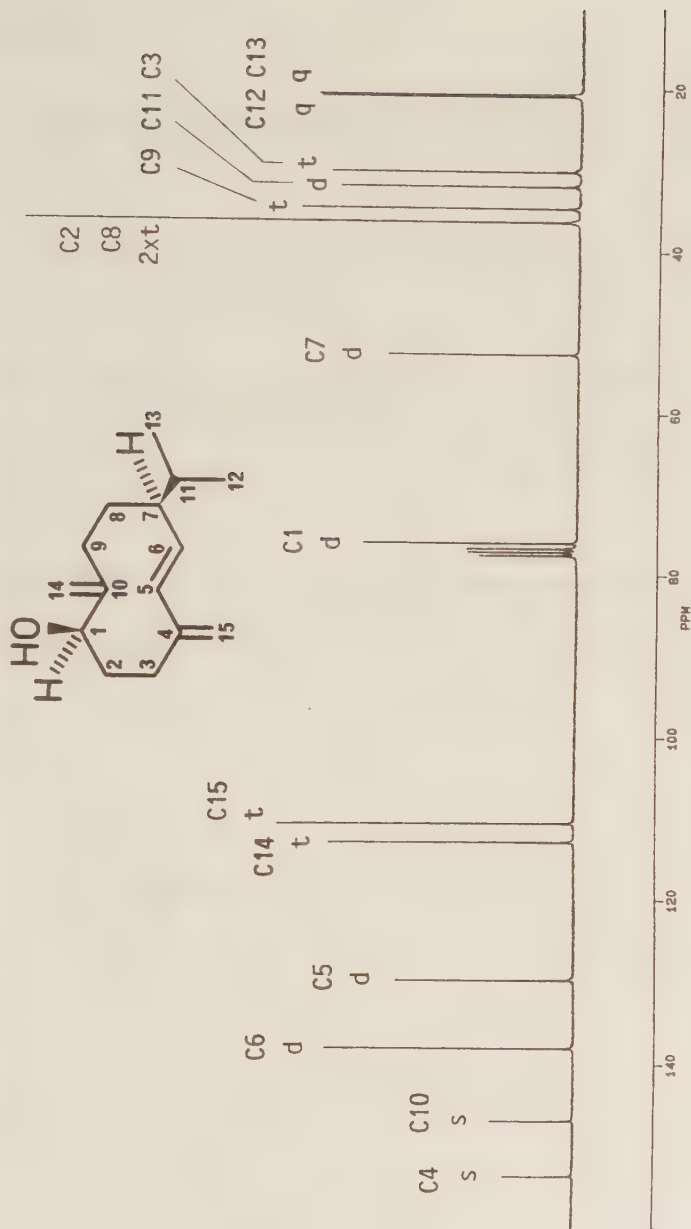
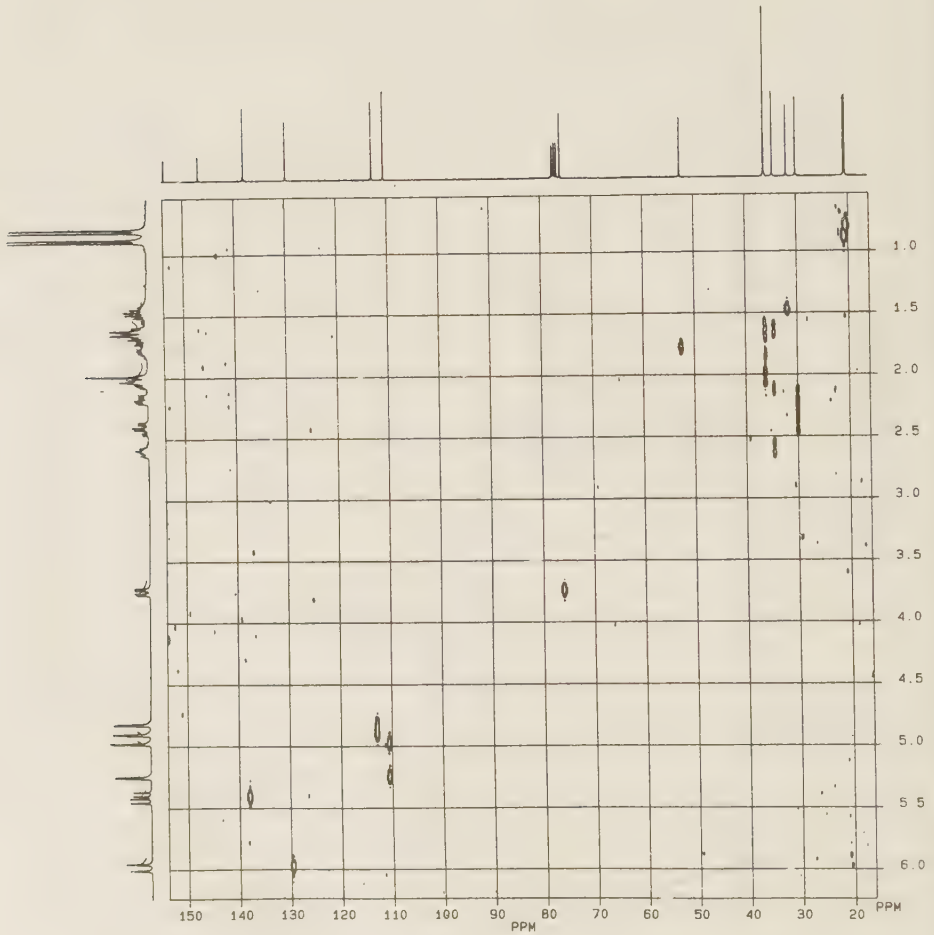


Abb.89 : ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektrum der Verbindung S1



4.3.8. Stereochemie

Verbindung S1 besitzt an C-1 und C-7 zwei asymmetrische Zentren und ist somit optisch aktiv. Die Messung des Drehwinkels ergab eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = -189,6^\circ$ ($c = 0,48$; Hexan).

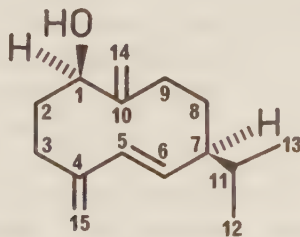
Ein Vergleich mit Literaturdaten von FATTORUSSO und Mitarb. [98] zeigte, daß Verbindung S1 in der 1S,7R-Konfiguration vorliegen mußte, wodurch sowohl die Hydroxyl- als auch die Isopropylgruppe β -ständig angeordnet sind. (Abb.90).

Die E-Konfiguration der endozyklischen Doppelbindung konnte aus der Kopplungskonstanten J_{H_5,H_6} von 16 Hz aus dem 1H -NMR-Spektrum bestimmt werden.

Die genaue Bezeichnung der Verbindung S1 lautet folglich (1S,7R)-Germacra-4(15), 5E,10(14)-trien-1-ol.

Eine Literaturrecherche ergab, daß diese Substanz bereits früher aus *Inula cuspidata* C.B. CLARKE [99] isoliert worden war. Das Vorkommen dieser Verbindung in *Echinacea*-Arten war bisher jedoch in der Literatur noch nicht beschrieben.

Abb.90 : (1S,7R)-Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1-ol (Verb.S1)



5. Vergleichende analytische HPLC-Untersuchungen von Echinacea-Extrakten und Fertigpräparaten

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde bereits darauf hingewiesen, daß ein großer Teil der auf dem Markt befindlichen Echinacea-Drogen und -extrakte verfälscht sind und daß einzelne Echinacea-Arten miteinander verwechselt werden. Aus diesem Grund wurden anhand der gefundenen Inhaltsstoffe geeignete analytische Methoden zur zweifelsfreien Identifizierung und Unterscheidung der einzelnen Echinacea-Arten und -drogenteile weiterentwickelt. Im Handel befindliche Echinacea-Fertigpräparate wurden in die Untersuchungen miteinbezogen.

5.1. Trennsysteme

Für die HPLC-Analytik der Echinacea-Inhaltsstoffe wählten wir Umkehrphasen-Material (RP-18) als stationäre Phase, da mit diesem Trennmaterial für niedermolekulare Verbindungen über einen großen Polaritätsbereich gute Auftrennungen erzielt werden können.

Als mobile Phase diente ein Acetonitril-Wasser-Gemisch. Durch Gradientenelution konnte die Analysenzeit verkürzt und Substanzen stark unterschiedlicher Polarität innerhalb eines Chromatogramms erfaßt werden.

Zur Analyse der hydrophilen Inhaltsstoffe (Kaffeesäurederivate) eignete sich ein Fließmittelgradient von 5 bis 25 % Acetonitril (linear in 20 Minuten), wobei ein Zusatz von 1% 0,1 N Phosphorsäure für eine gute Auftrennung der Substanzen und zur Verhinderung eines Peak-Tailings notwendig war. Die Detektion erfolgte bei 330 nm.

Für die HPLC-Analytik der lipophilen Inhaltsstoffe (Alkylamide und Polyacetylene) verwendeten wir ein Gradientensystem von 40 bis 80 % Acetonitril linear in 30 Minuten. Als Detektionswellenlänge wählten wir 210 bzw. 254 nm. Die einzelnen Parameter sind in den jeweiligen Kapiteln noch einmal angegeben.

Die Peakidentifizierung und -zuordnung erfolgte durch die Retentionszeit, Co-Chromatographie mit den isolierten und strukturell aufgeklärten Reinsubstanzen sowie durch Vergleich der durch Photodiodenarray-Detektion online aufgenommenen UV-Spektren.

5.2. Analytik der hydrophilen Inhaltsstoffe

5.2.1. Oberirdische Teile

Zur Probenvorbereitung wurden die Untersuchungslösungen von stark lipophilen Begleitstoffen (Chlorophylle, etc.) gereinigt, da diese das reversed-phase-Trennmateriale nach kurzer Zeit unbrauchbar gemacht hätten. Dazu wurde das Drogenmaterial vor der eigentlichen Extraktion mit Chloroform entfettet, da die Kaffeesäurederivate in diesem Lösungsmittel unlöslich sind. Als zweite Möglichkeit wurde die Filtration über C-18-SepPak-Kartuschen (Fa. Waters) verwendet, wobei die lipophilen Bestandteile auf dem Umkehrphasenmaterial gebunden blieben, während die zu untersuchenden Verbindungen sich mit Acetonitril 50 % eluieren ließen.

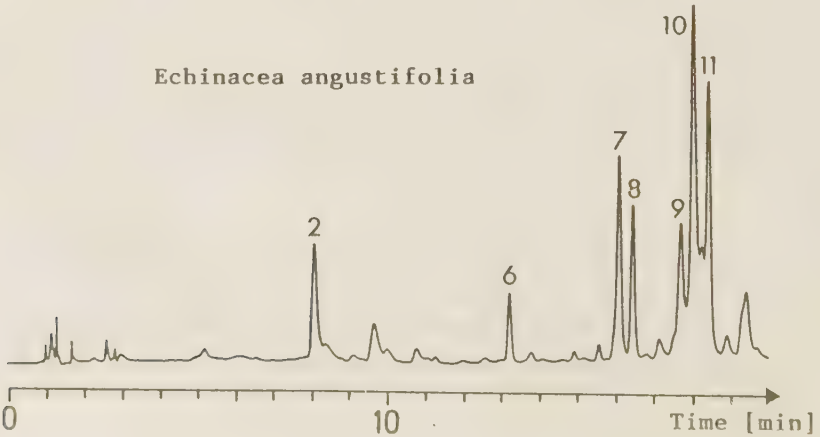
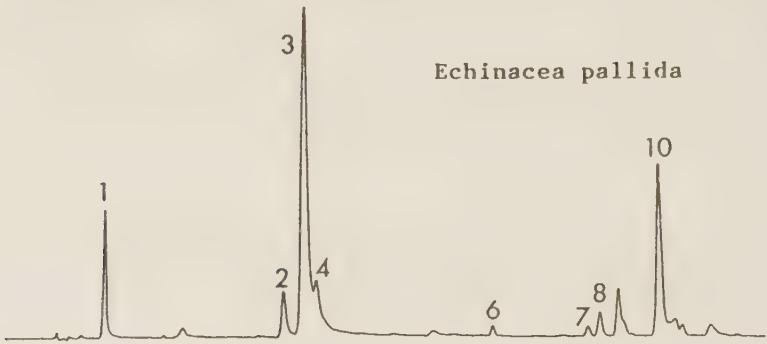
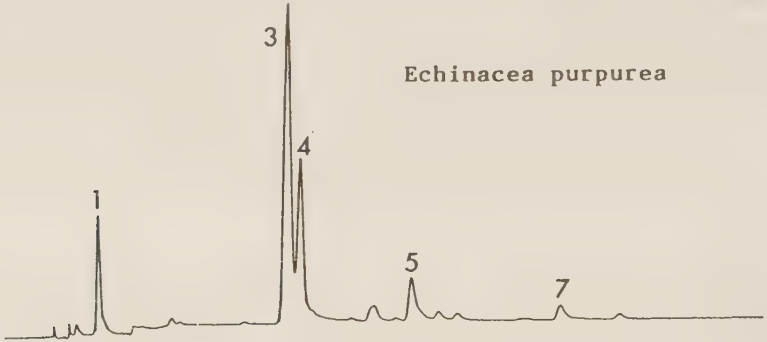
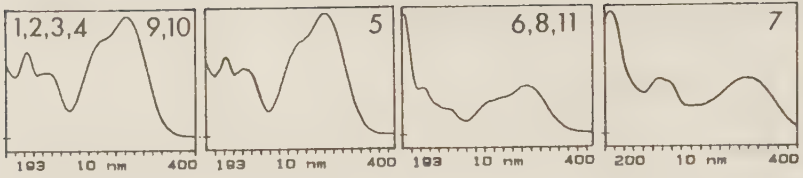
Abbildung 91 stellt die HPLC-Trennungen der hydrophilen Bestandteile des Krautes von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* dar. Es zeigte sich, daß Cichoriensäure der Hauptinhaltsstoff im Kraut von *E. purpurea* und *E. pallida* ist, während *E. angustifoliae herba* davon nur Spuren enthält. 2-Caffeoyl-weinsäure ist ebenfalls nur in *E. purpurea* und *E. pallida* vorhanden. Chlorogensäure und die Isochlorogensäuren konnten von uns dagegen nur im Kraut von *E. angustifolia* und *E. pallida* nachgewiesen werden, nicht aber in *E. purpurea*.

Das bisher nur in den Wurzeln von *E. angustifolia* bekannte Echinacosid konnten wir erstmals auch in den Blüten von *Echinacea angustifolia* (Gehalt 0,1 - 1 %) und *E. pallida* (Spuren) nachweisen. Das strukturell verwandte Verbascosid kommt ebenfalls nur in den Blüten von *E. angustifolia* und *E. pallida* vor.

In einer weiteren Versuchsreihe untersuchten wir von allen drei Arten getrennt Blüten, Blätter und Stengel. Dabei erwies sich der Gehalt an Kaffeesäurederivaten in den Blüten stets um ein Vielfaches höher als im übrigen Kraut. Bei *Echinacea angustifolia* und *E. pallida* stellten wir fest, daß die Isochlorogensäuren sowie die Caffeoylglykoside Echinacosid und Verbascosid jeweils nur in den Blüten enthalten sind.

Abb.91 : HPLC-Trennungen der hydrophilen Fraktion aus den oberirdischen Teilen von *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* (Trennsystem HPLC-T1; 1= 2-Caffeoyl-weinsäure; 2= Chlorogensäure; 3= Cichoriensäure; 4= Isomeres der Cichoriensäure; 5= Cichoriensäuremethylderivat; 6= Echinacosid; 7= Rutin; 8= Verbascosid; 9,10= Isochlorogensäuren; 11= nicht identifiziert)

Abb.91 :



5.2.2. Wurzeln

Die HPLC-Analyse der hydrophilen Fraktionen der Wurzeln der drei Echinacea-Arten (Abb.92) zeigte, daß sich die Kaffeesäurederivate im Falle von *Echinacea purpurea* radix qualitativ nicht von denen des Krautes unterscheiden.

Dagegen weicht das hydrophile Inhaltsstoffmuster der Wurzeln von *E. angustifolia* und *E. pallida* signifikant von dem der jeweiligen oberirdischen Teile ab. In beiden Wurzeln ist Echinacosid der Hauptinhaltsstoff. In *E. angustifoliae* radix ist zusätzlich Cynarin enthalten, welches von uns erstmals nachgewiesen werden konnte. Bei Cynarin könnte es sich, da es in *E. purpurea* und *E. pallida* bisher nicht nachgewiesen werden konnte, um eine Leitsubstanz zur Identitätsprüfung von *E. angustifolia* handeln.

5.2.3. Gehaltsbestimmung der Cichoriensäure

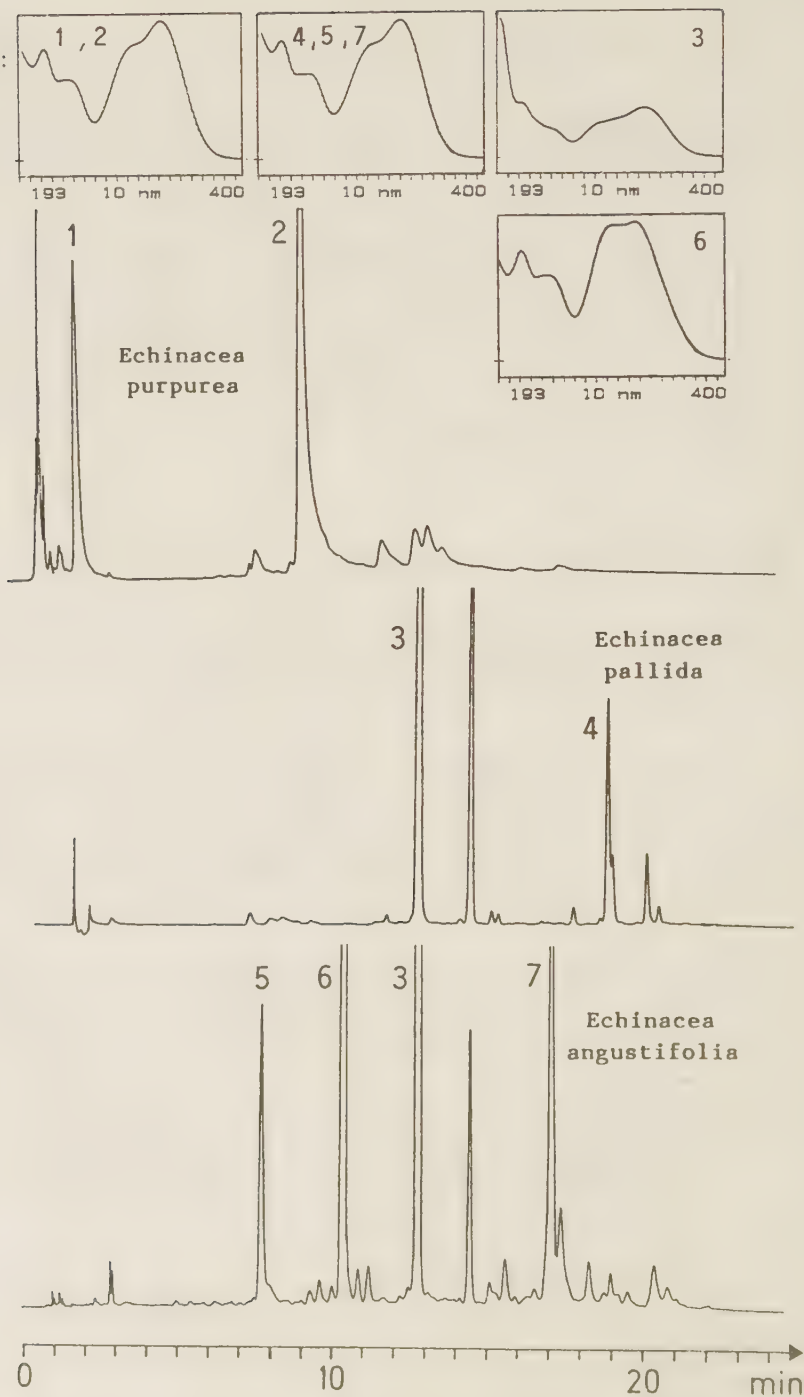
In insgesamt 33 Chargen Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* wurde jeweils durch HPLC unter Verwendung eines Externen Standards der Gehalt an Cichoriensäure ermittelt.

Zur Probenaufbereitung wurden die pulverisierten Drogen zunächst mit Chloroform entfettet. Dabei wurde der größte Teil des Chlorophylls und anderer lipophiler Begleitstoffe entfernt, während die Kaffeesäurederivate nicht in Lösung gingen. Anschließend wurden die Drogen mit Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden schonend zur Trockne eingeengt und in Methanol gelöst.

Als Eichlösung diente eine Lösung von 2 mg Cichoriensäure in 10,00 ml Methanol. Die Eichgerade zeigte Linearität nach Höhenintegration im Bereich von 0,4 bis 2,8 µg Cichoriensäure. Der Korrelationskoeffizient betrug 0,99897.

Abb.92: HPLC-Trennungen der hydrophilen Fraktion aus den Wurzeln von *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* (Trennsystem HPLC-T1; 1= 2-Cafeyolweinsäure; 2= Cichoriensäure; 3= Echinacosid; 4,7= Isochlorogensäuren; 5= Chlorogensäure; 6= Cynarin)

Abb.92 :

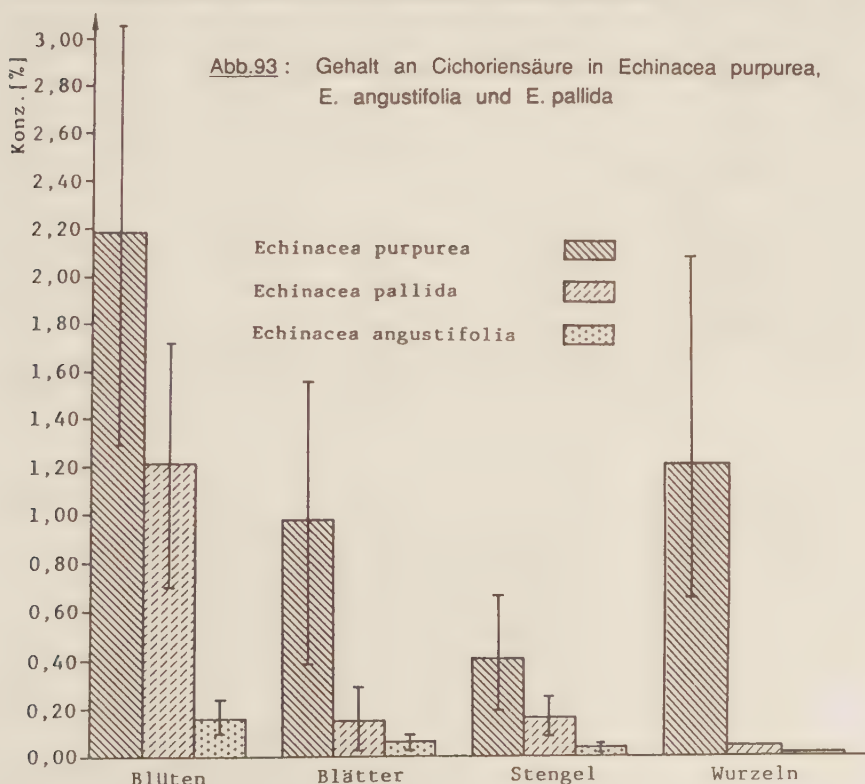


Die Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode wurde durch mehrmalige Einspritzung jeder Probe überprüft. Die relativen Standardabweichungen betrugen max. 5,4 % .

Um die Reproduzierbarkeit der Extraktbereitung nachzuweisen, wurde von einzelnen Chargen mehrmals der Gehalt überprüft. Die absoluten Abweichungen beliefen sich auf etwa $\pm 0,1$ % .

In Tabelle 4 und Abb. 93 sind die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung aufgelistet. Zwischen den einzelnen Chargen einer Art wurden relativ große Schwankungen im Gehalt festgestellt. Trotzdem ist erkennbar, daß der Gehalt an Cichoriensäure in der Reihenfolge *E. purpurea* > *E. pallida* >> *E. angustifolia* abnimmt.

Bei den einzelnen Pflanzenteilen ist eine Abstufung in der Reihenfolge Blüten > Wurzeln (nur bei *E. purp.*) > Blätter > Stengel zu beobachten. Der zum Teil sehr hohe Gehalt an Cichoriensäure in den Blüten (*E. purpurea* > 3%) macht deutlich, wie sehr die Drogenzusammensetzung das Inhaltsstoffmuster beeinflusst.



Tab.4 : Gehalt an Cichoriensäure in *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* in % vom Drogentrockengewicht (Mittelwerte aus mindestens zwei Bestimmungen; n.n.= nicht nachweisbar)

	Blüten	Blätter	Stengel	Wurzeln
<i>Echinacea purpurea</i>				
Charge 1	2,06	0,55	0,65	2,07
Charge 2	1,39	0,73	0,29	0,94
Charge 3	3,12	1,65	0,26	0,65
Mittelwert	2,19	0,98	0,40	1,22
<i>Echinacea pallida</i>				
Charge 1	1,82	0,08	0,14	n.n.
Charge 2	0,93	0,07	0,09	n.n.
Charge 3	0,89	0,29	0,25	0,05
Mittelwert	1,21	0,15	0,16	----
<i>Echinacea angustifolia</i>				
Charge 1	0,11	0,04	0,03	n.n.
Charge 2	0,20	0,08	0,04	n.n.
Mittelwert	0,16	0,06	0,04	----

5.3. Analytik der lipophilen Inhaltsstoffe

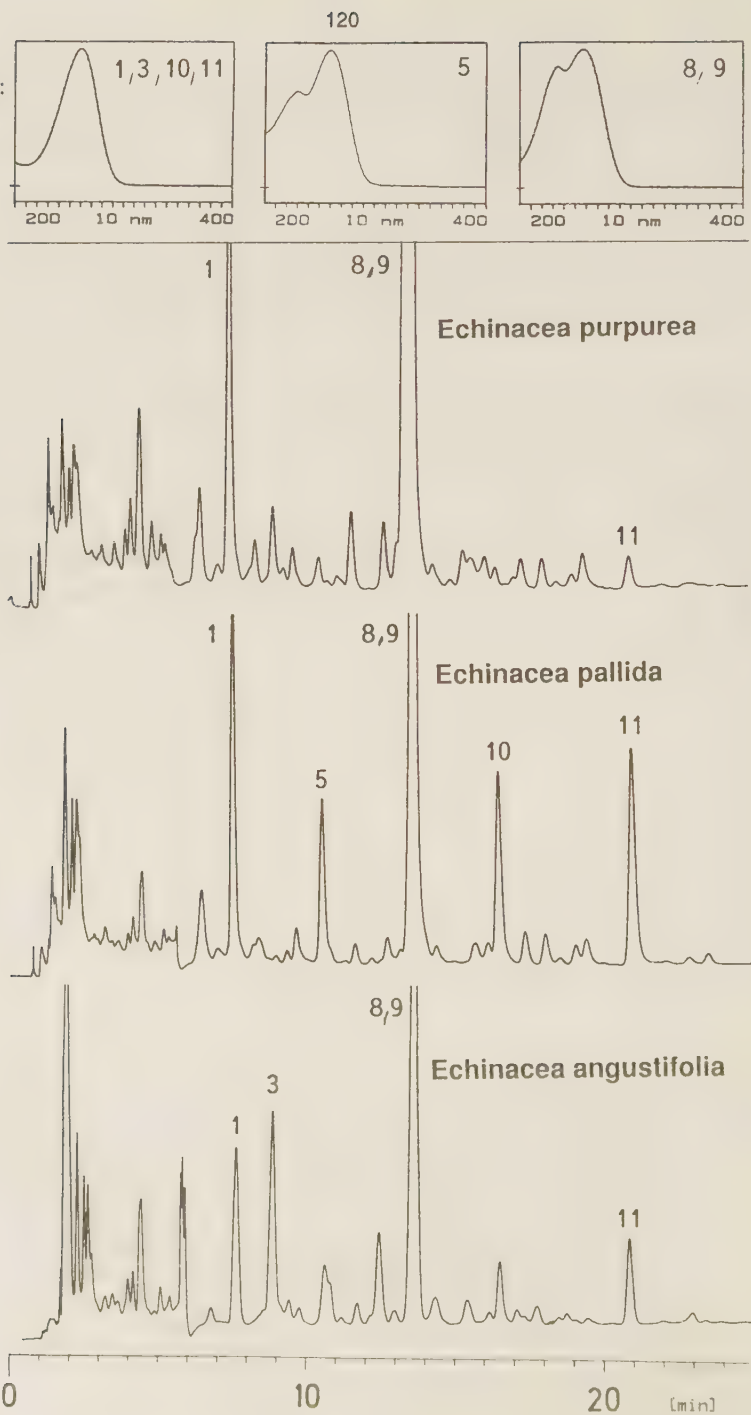
5.3.1. Oberirdische Teile

Zur Untersuchung der lipophilen Bestandteile aus dem Kraut von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* wurden aus dem Extrakt störende Begleitstoffe (Chlorophylle) durch eine Bleiacetattfällung abgetrennt. Anschließend wurden die lipophilen Inhaltsstoffe durch Ausschüttelung mit Chloroform angereichert.

Für die HPLC-Trennung verwendeten wir ein Trennsystem von 40 - 80 % Acetonitril in 30 Minuten bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm. Abbildung 94 zeigt die HPLC-Trennungen der lipophilen Bestandteile aus den Herba-Drogen. Aus den UV-Spektren wird deutlich, daß im Kraut aller drei *Echinacea*-Arten, vor allem in den Blütenköpfen, Isobutylamide vom 2,4-Dienamid-Typ enthalten sind, wobei sich die einzelnen Inhaltsstoffmuster kaum unterscheiden. Als Hauptinhaltsstoffe konnten wir die beiden isomeren Isobutylamide der Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure identifizieren.

Abb.94 : HPLC-Trennung der lipophilen Fraktion aus den oberirdischen Teilen von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* (Trennsystem HPLC-T4; **1**= Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; **3**= Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; **5**= Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid; **8,9**= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide; **10**= Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid; **11**= Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid)

Abb.94 :



5.3.2. Wurzeln

Die HPLC-Analyse der lipophilen Bestandteile der Wurzeln von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* wurde mit einem Fließmittelgradienten von 40 - 80 % Acetonitril bei einer Detektionswellenlänge von 210 nm durchgeführt.

Aus den erhaltenen Fingerprint-Chromatogrammen (Abb.95) ist ersichtlich, daß die Wurzeln von *E. purpurea* und von *E. angustifolia* jeweils ein komplexes Gemisch von Alkylamiden, überwiegend Isobutylamide, enthalten. Während in früheren Untersuchungen [46] berichtet wurde, daß *E. purpurea* und *E. angustifolia* dieselben Amide enthalten, konnten wir feststellen, daß die Amidfraktionen in den Wurzeln beider Arten unterschiedlich zusammengesetzt sind. *E. purpureae radix* enthält überwiegend Alkylamide vom 2,4-Dienamid-Typ, wogegen die Amide aus *E. angustifoliae radix* vorzugsweise eine 2-Monoenamid-Struktur aufweisen.

Im Gegensatz dazu sind Alkylamide in der lipophilen Wurzelfraktion von *E. pallidae radix* nur in Spuren enthalten. Die Hauptverbindungen sind hier Polyine und Polyene vom 2-Ketoalkin- und 2-Ketoalken-Typ [38], welche sich nach DC und HPLC etwas lipophiler verhalten als die Alkylamide.

Anhand der durch Photodiodenarray-Detektion aufgenommenen UV-Spektren der eluierten Substanzen kann eine eindeutige Unterscheidung zwischen den drei verschiedenen Wurzeln getroffen werden, da die jeweiligen Hauptinhaltsstoffe charakteristische UV-Spektren besitzen (Abb.95).

Der Vergleich der lipophilen Inhaltsstoffe von oberirdischen Teilen und Wurzeln zeigt, daß in *Echinaceae purpureae radix* neben den Isobutylamiden des Krautes noch einige weitere Alkylamide nachweisbar sind. *E. angustifoliae radix* enthält dagegen überwiegend andere Isobutylamide als das Kraut. Ketoalkine und -alkene konnten nur in den Wurzeln von *E. pallida* identifiziert werden, nicht jedoch in den oberirdischen Teilen.

Abb.95 : HPLC-Trennungen der lipophilen Fraktion aus den Wurzeln von *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* mit UV-Spektren (Trennsystem HPLC-T3; 1= Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 2= Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 3= Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 4= Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid; 5=Dode-

ca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid; **6**= Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid; **7**= Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid; **8,9**= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide; **10**= Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid; **11**= Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid; **12**= Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid; **13**= Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid; **14**= Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid; **15**= Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid; **16**= Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid; **17**= Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid; **18**= Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid; **19**= Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid; **20**= 8-Hydroxy-tetradeca-9E-en-11,13-diin-2-on; **21**= 8-Hydroxy-pentadeca-9E-en-11,13-diin-2-on; **22**= Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on; **24**= Pentadeca-8Z,13Z-dien-11-in-2-on; **25**= Pentadeca-8Z,11Z,13E-trien-2-on)

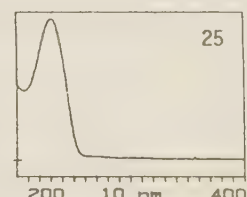
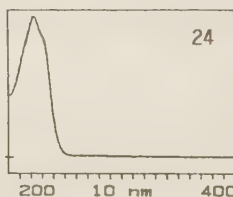
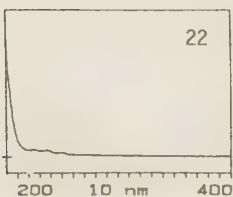
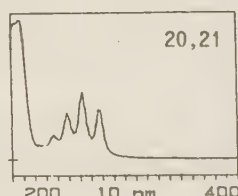
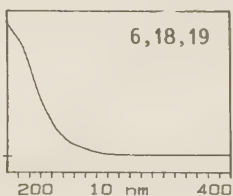
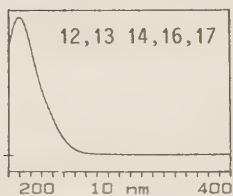
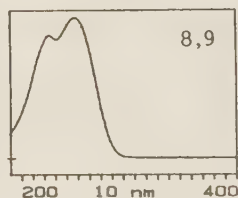
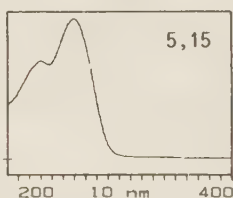
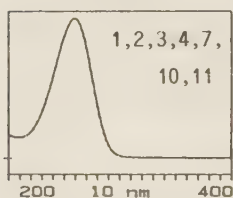
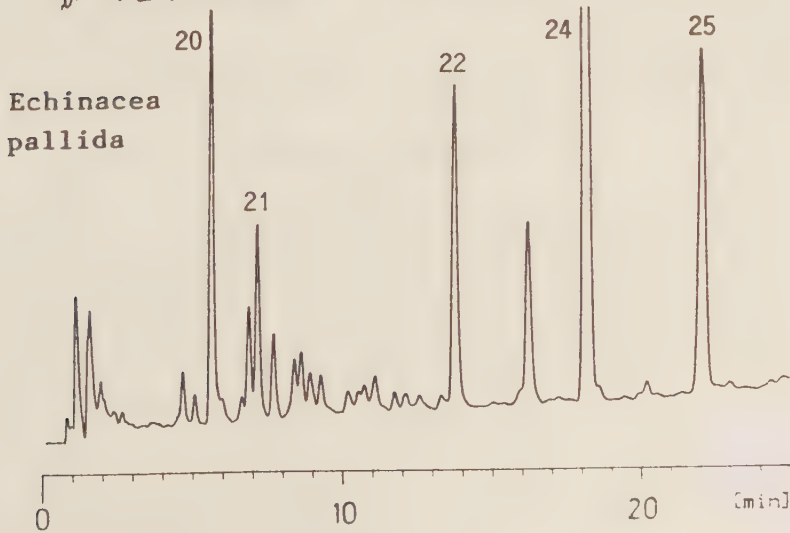
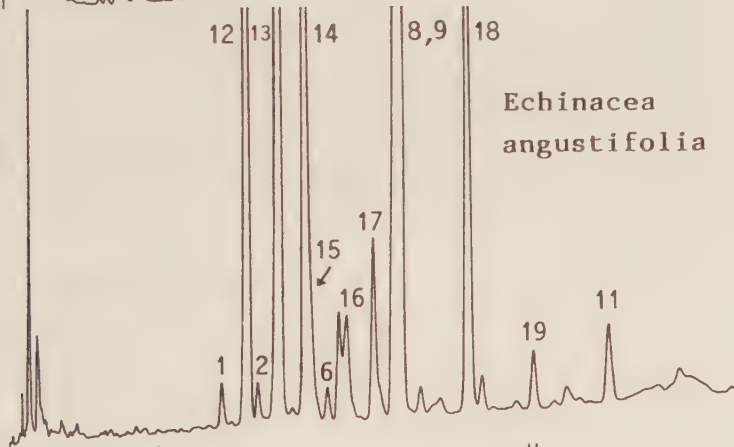
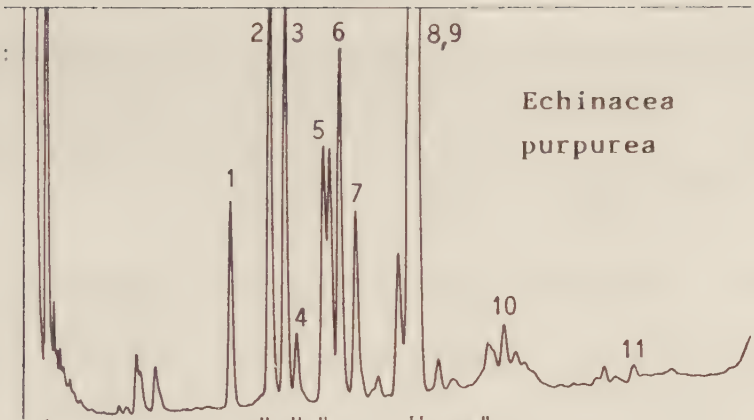


Abb.95 :



Das von JACOBSON [45] 1967 in *Echinacea angustifolia* und *E. pallida* beschriebene Echinacein (=Dodeca-2E,6Z,8E,10E-tetraensäure-isobutylamid) konnte in keiner Charge aufgefunden werden. Somit liegt der Schluß nahe, daß es sich bei dem erwähnten Echinacein um kein einheitliches Produkt gehandelt hat, wie andere Autoren bereits vermuteten [46,100].

5.3.3. Gehaltsbestimmung der 2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide

Der Gehalt der beiden isomeren Isobutylamide der Dodeca-2E,4E,8Z,10E- und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraensäure, welche in den oberirdischen Teilen der drei Arten sowie in den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia* mengenmäßig dominieren, wurde mittels HPLC unter Verwendung eines Externen Standards bestimmt.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung. Der Gehalt in *Echinaceae purpureae herba* lag zwischen 6 und 27 mg%, in *E. pallidae herba* bei 1-13 mg% und in *E. angustifoliae herba* 1 - 5 mg% . In den Wurzeln von *E. purpureae* konnten wir 3 - 39 mg% nachweisen, während *E. angustifoliae radix* zwischen 9 und 151 mg% der genannten Verbindungen enthielt.

In den Wurzeln von *E. pallida* war kein Dodecatetraensäure-isobutylamid nachzuweisen, obwohl in unserem HPLC-Trennsystem eine Verbindung mit derselben Retentionszeit zu beobachten war. Dieser Peak stammte jedoch von einem Ketoalkin, dem Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on [38], welches aufgrund des abweichenden UV-Spektrums von den obengenannten Alkylamiden unterschieden werden kann.

Tab.5 : Gesamtgehalt an Dodeca-2E,4E,8Z,10E- und Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraensäure-isobutylamid im Kraut und in den Wurzeln von *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* in mg% vom Drogentrockengewicht

	<i>E.purpureae</i> herba	<i>E.pallidae</i> herba	<i>E.angustif.</i> herba
Charge 1	27	1	2
Charge 2	10	3	5
Charge 3	6	5	1,4
Charge 4	18	13	---
Mittelwert	15	5	3

	<i>E. purpureae</i> radix	<i>E. angustifol.</i> radix
Charge 1	4	9
Charge 2	3	10
Charge 3	3	71
Charge 4	11	123
Charge 5	15	151
Charge 6	39	---
Mittelwert	12	73

5.4. Untersuchung von homöopathischen Urtinkturen

Um festzustellen, ob Unterschiede im Inhaltsstoffmuster von Extrakten aus getrockneten Drogen und Frischpflanzen bestehen, stellten wir homöopathische Urtinkturen von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* nach den Vorschriften des HAB 1 her. Da für *E. pallida* keine Monographie im HAB 1 enthalten ist, fertigten wir die Urtinktur nach der entsprechenden Vorschrift von *E. angustifolia* an.

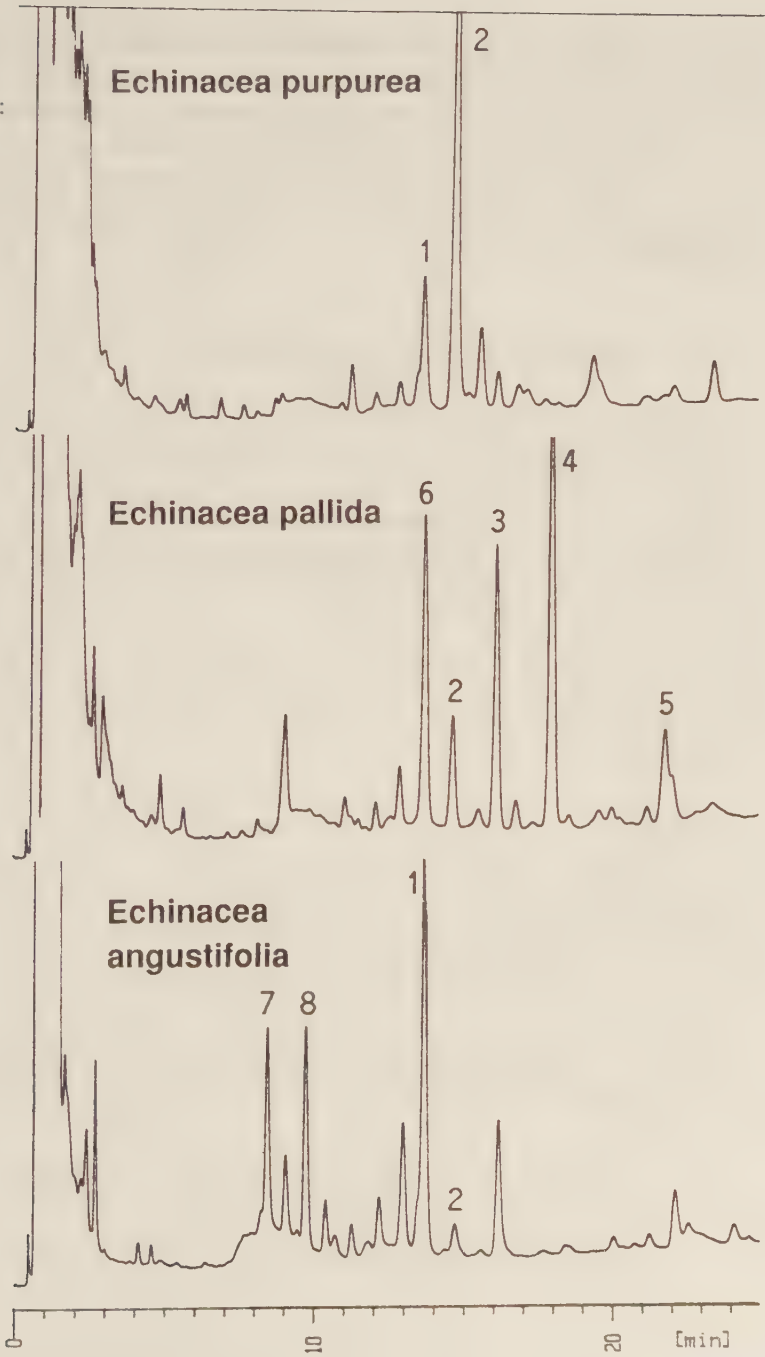
Die HPLC-Trennungen der hydrophilen Fraktionen der Urtinkturen unterschieden sich zwar qualitativ nicht von den entsprechenden Fingerprints der getrockneten Drogen, jedoch war bei den Urtinkturen von *Echinacea purpurea* und *E. pallida* der Gehalt an Cichoriensäure deutlich vermindert. Im Kapitel 5.7. (Stabilitätsuntersuchungen) wird auf diese Erscheinung näher eingegangen.

Die HPLC-Chromatogramme der lipophilen Fraktionen der Urtinkturen aller drei *Echinacea*-Arten (Abb.96) wiesen gegenüber den getrockneten Drogen eine zusätzliche Hauptverbindung bei 15,5 Minuten auf, welche wir als Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1 β -ol identifizieren konnten (siehe Kap.4). Unsere Untersuchungsergebnisse mit zahlreichen Frischpflanzen- und Trockendrogenextrakten zeigten, daß das Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1 β -ol nur in Frischpflanzen vorkommt und somit für eine Unterscheidung von Extrakten aus frischer und getrockneter Herba-Droge von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* herangezogen werden kann. Daneben enthielt die Urtinktur von *E. purpurea*, die nur aus den frischen oberirdischen Teilen hergestellt wird, Isobutylamide, welche wir bereits vorher im getrockneten Kraut aufgefunden hatten. In der aus der frischen Ganzpflanze hergestellten Urtinktur von *E. angustifolia* waren neben dem Sesquiterpenalkohol die Dodecatetraensäure-isobutylamide sowie weitere Isobutylamide aus den Wurzeln deutlich enthalten.

Die Urtinktur von *E. pallida* (aus der frischen Ganzpflanze) enthielt zwar ebenfalls den Sesquiterpenalkohol, unterschied sich jedoch von den vorherigen Urtinkturen durch das Auftreten von Polyacetylenen bei einer Retentionszeit von 13,8, 18,1 und 21,9 Minuten. Diese stammten aus der Wurzel und bieten somit eine Möglichkeit der Unterscheidung der Urtinktur von *E. pallida* zu denen von *E. purpurea* und *E. angustifolia*. Ihre Konzentration kann jedoch je nach Wurzelanteil schwanken.

Abb.96: HPLC-Trennungen der lipophilen Fraktion aus den Urtinkturen von *E. purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* (Trennsystem HPLC-T3; 1= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid; 2= Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1 β -ol; 3= Pentadeca-8Z-en-11,13-diin-2-on; 4= Pentadeca-8Z,13Z-di-en-11-in-2-on; 5= Pentadeca-8Z,11Z,13E-trien-2-on; 6= Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on; 7= Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid; 8= Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid)

Abb.96 :



Als Ergebnis kann somit festgehalten werden, daß durch die Verwendung frischen Drogenmaterials bei der Herstellung der homöopathischen Urtinkturen im lipophilen Bereich bei allen drei Echinacea-Arten gegenüber Extrakten aus getrockneten Drogen ein zusätzlicher Inhaltsstoff, das Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1 β -ol, nachweisbar ist. Im Bereich der Kaffeesäurederivate sind vor allem quantitative Unterschiede zu Extrakten aus getrockneten Drogen erkennbar, offensichtlich aufgrund von Umlageungsvorgängen (s.Kap.5.7.).

5.5. Untersuchung von Echinacea-Fertigpräparaten

Mit den von uns entwickelten analytischen Methoden untersuchten wir neben selbsthergestellten Extrakten auch handelsübliche Echinacea-Fertigpräparate. Die Präparate enthalten meist wäßrig-alkoholische Auszüge, wobei sehr häufig Kombinationen mit anderen Pflanzenextrakten zur Anwendung kommen. Da die Extrakte zudem oft stark verdünnt sind, mußte für die Untersuchung derartiger Phytopharmaka besonderer Wert auf die Probenvorbereitung gelegt werden.

Wir entwickelten für die Fertigpräparate eine Analysenmethode, mit der die Inhaltsstoffe im Verhältnis 1:60 angereichert wurden. Es wurde dabei jeweils eine hydrophile und eine lipophile Fraktion hergestellt, die wir anschließend mit DC und HPLC untersuchten.

Die Abbildungen 97 und 98 zeigen die HPLC-Trennungen der hydrophilen und lipophilen Bestandteile von zwei aus wäßrig-alkoholischen Extrakten hergestellten Handelspräparaten. Präparat 1 enthält laut Deklaration neben anderen Extrakten ein Perkolat aus den Wurzeln von *E. purpurea* und *E. angustifolia*.^{*} Eindeutig zu identifizieren waren sowohl im hydrophilen als auch im lipophilen Bereich nur die Bestandteile aus *E. purpureae radix*. Das Präparat 2 enthält laut Angabe die Urtinktur von *E. purpurea* kombiniert mit weiteren Extrakten.^{**} Chromatographisch konnten wir sowohl die hydrophilen als auch die lipophilen Bestandteile des Krautes von *E. purpurea* nachweisen, jedoch nicht den Peak des Sesquiterpenalkohols.

* Zusammensetzung Präparat 1: Herb. Thujae occid. rec. (Perkolat 1=5) 0,5 ml; Rad. Baptisiae tinct. (Perkolat 1=5) 1,0 ml; Rad. Echinaceae (angust. et purpur.) (Perkolat 1=10) 1,5 ml

** Zusammensetzung Präparat 2: Echinacea purp. Urtinktur 50,0 g; Eupatorium perfol. D3 1,7 g; Thuja 1,2 g

Abb.97 : HPLC-Trennungen der hydrophilen Fraktion der Präparate 1 und 2 (Trennsystem HPLC-T1; 1= 2-Caffeoyl-weinsäure; 2= Cichoriensäure; 3= Kaffeesäure)

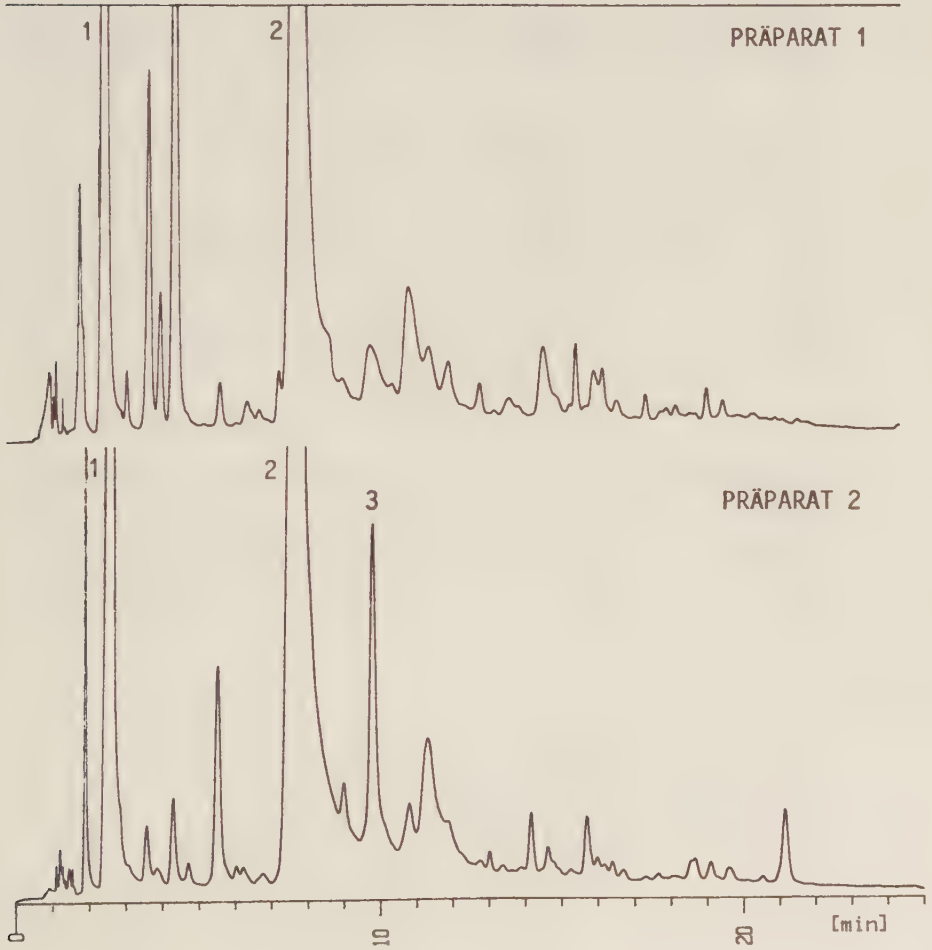
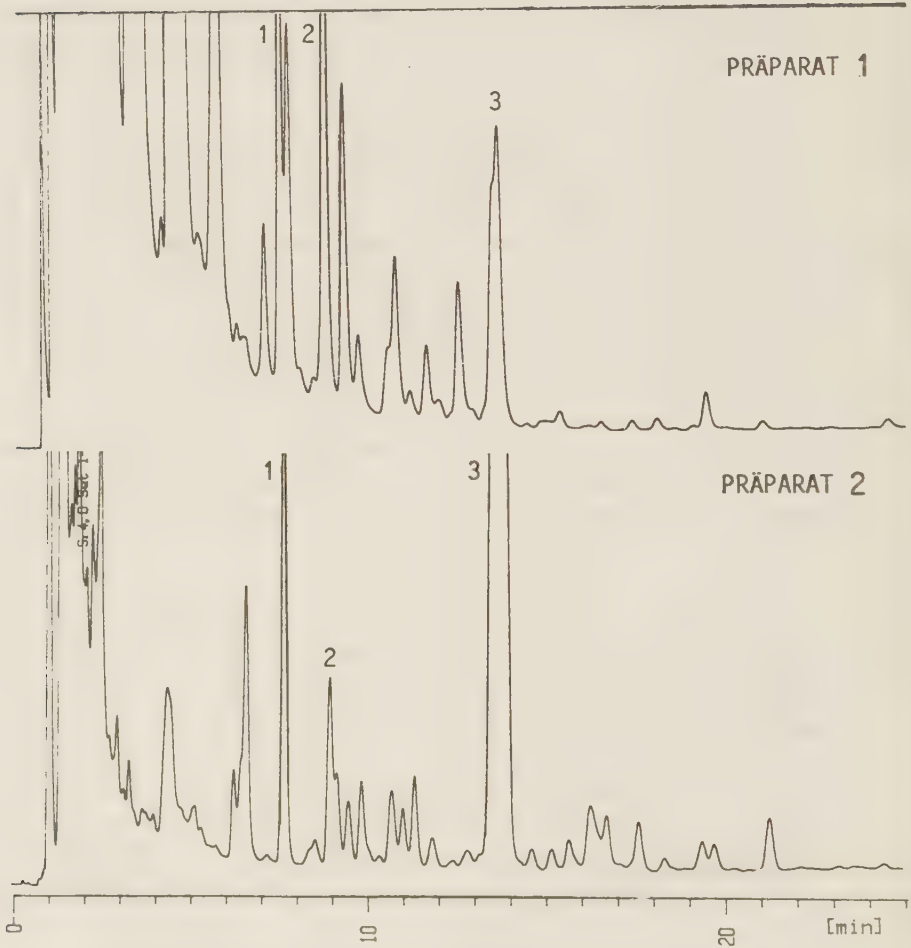


Abb.98: HPLC-Trennungen der lipophilen Fraktion der Präparate 1 und 2 (Trennsystem HPLC-T4; 1= Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 2= Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 3= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid)



Die Analyse zweier handelsüblicher homöopathischer Urtinkturen von *E. purpurea* und *E. angustifolia* lieferte folgende Ergebnisse:

Das Chromatogramm der Urtinktur von *E. purpurea* (Präparat 3) entsprach zwar qualitativ der von uns hergestellten Urtinktur, jedoch war die Konzentration der Inhaltsstoffe sehr gering. Die als "*E. angustifolia*" deklarierte Urtinktur (Präparat 4) konnte aufgrund der charakteristischen Ketoalkine und -alkene als Extrakt aus *E. pallida* identifiziert werden (Abb.99).

Daneben untersuchten wir ein Präparat, das den verdünnten Preßsaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea* enthält* (Präparat 5). Die nach Anreicherung der Inhaltsstoffe durchgeführten HPLC-Trennungen (Abb.100) zeigten im lipophilen Bereich eine gute Übereinstimmung mit den von uns hergestellten Extrakten aus den oberirdischen Teilen. Das Chromatogramm der hydrophilen Bestandteile des Preßsaftes unterschied sich vom Fingerprint der getrockneten Droge durch das Fehlen von Cichoriensäure und zeigte einen Hauptpeak bei etwa 13 min. (s.Kap. 5.7. "Stabilitätsuntersuchungen").

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die von uns entwickelten Analysemethoden sich auch zur Untersuchung von handelsüblichen Echinacea-Fertigpräparaten eignen. Da von den Präparaten nur Einzelmuster untersucht wurden, können die jeweiligen Ergebnisse nicht als repräsentativ für das Arzneimittel gelten, sondern haben lediglich Stichprobencharakter.

* Zusammensetzung Präparat 5: 100 g enthalten 80,0 g Preßsaft aus *Herba recens Echinaceae purpureae*

Abb.99: HPLC-Trennungen der lipophilen Fraktion der Präparate 3 und 4 (Trennsystem HPLC-T3; 1= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid; 2= Tetradeca-8Z-en-11,13-diin-2-on; 3= Pentadeca-8Z-en-11,13-diin-2-on; 4= Pentadeca-8Z,13Z-dien-11-in-2-on; 5= Pentadeca-8Z,11Z,13E-trien-2-on)

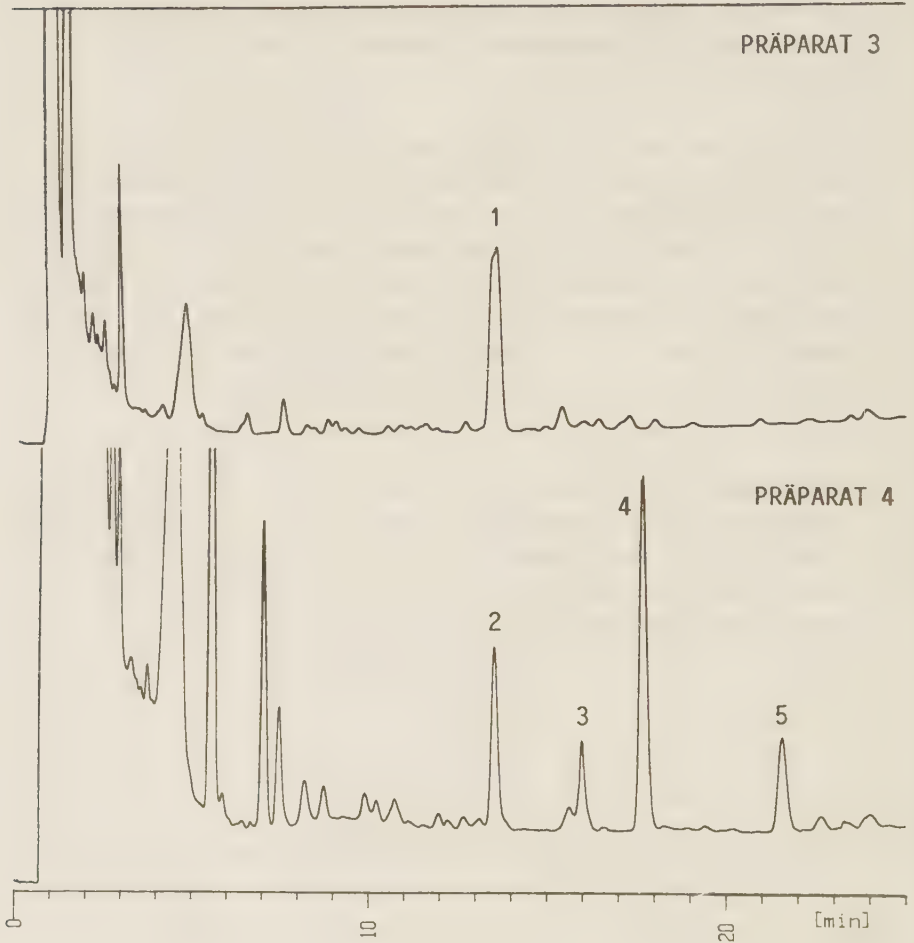
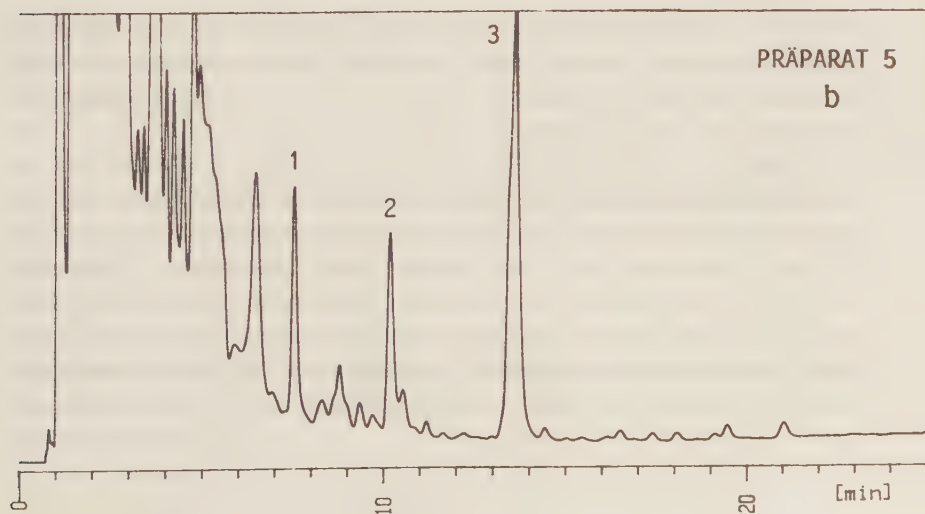
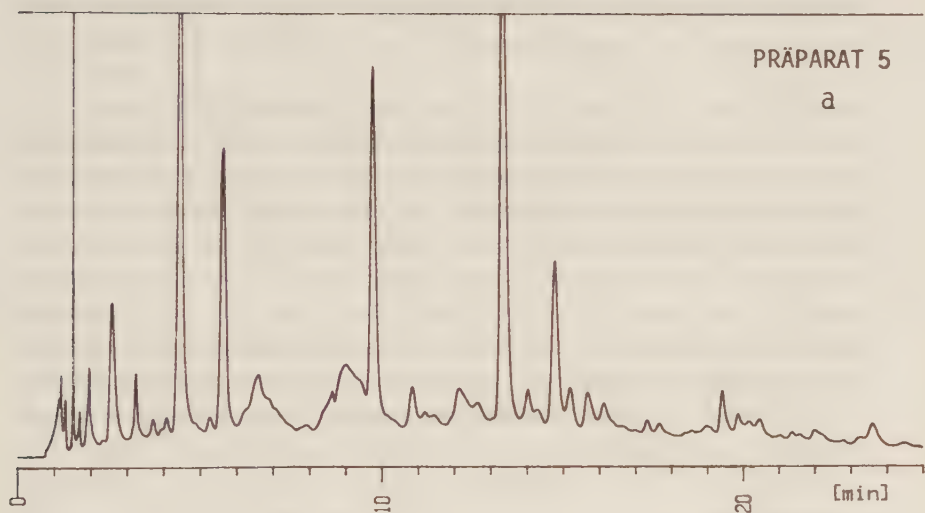


Abb.100 : HPLC-Trennungen der hydrophilen (a) und lipophilen (b) Fraktion von Präparat 5 (Trennsysteme: (a) HPLC-T1; (b) HPLC-T4; 1= Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid; 2= Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid; 3= Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid)



5.6. Analytik der Arzneibücher

Das DAB 9 enthält eine Monographie "Sonnenhutwurzel" (*Echinaceae angustifoliae radix*). Die Identitätsprüfung erfolgt mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, wobei Rutin (Rutosid) als Referenzsubstanz verwendet wird. Die Identität der Droge wird dabei hauptsächlich durch den Inhaltsstoff Echinacosid nachgewiesen, welcher nach Detektion mit Naturstoffreagenz/PEG eine intensiv grüngelb fluoreszierende Zone liefert.

Eine Abgrenzung zu der häufig mit *E. angustifolia* verwechselten *Echinaceae pallidae radix* kann durch diese Vorschrift nicht vorgenommen werden, da unsere Untersuchungen zeigten, daß Echinacosid auch in den Wurzeln von *E. pallida* vorkommt. Mit der Arzneibuchvorschrift erhielten wir für beide Drogen ein fast identisches Chromatogramm.

Es ist zu vermuten, daß für die Erstellung der DAB-Monographie eine *E. pallidae radix*-Droge vorgelegen hatte, da bei der einleitenden Beschreibung der Droge ein "anfangs leicht süßer, später schwach bitterer, adstringierender Geschmack" angeführt wird. Dies trifft jedoch eher auf *E. pallidae radix* zu, da beim Kauen von *E. angustifoliae radix* eine intensive lokalanästhetische Wirkung auf der Zunge hervorgerufen wird.

Das Homöopathische Arzneibuch enthält je eine Monographie für *Echinacea angustifolia* und *Echinacea purpurea*. Von *E. angustifolia* wird zur Bereitung der Urtinktur die frische, blühende Ganzpflanze, von *E. purpurea* nur die frischen oberirdischen Teile blühender Pflanzen verwendet.

Der Identitätsnachweis wird auch hier dünn-schichtchromatographisch durchgeführt, wobei im Gegensatz zum DAB 9 die lipophilen Bestandteile aufgetrennt werden. Bei *Echinacea angustifolia* sollen nach Entwicklung einer angereicherten Untersuchungslösung und nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure verschiedene gefärbte Zonen sichtbar sein. Die angegebenen Zonen beschreiben jedoch eindeutig das Bild eines *Echinacea pallida*-Extraktes, wobei insbesondere der gelb-braune Fleck bei $R_{\text{st}} 1,3$ von Ketoalkinen und Ketoalkenen aus der Wurzel von *E. pallida* hervorgerufen wird.

Im Chromatogramm von *Echinacea purpurea* sind kaum Zonen zu sehen, da keine Anreicherung der Urtinktur vorgenommen wird. Die in der Vorschrift angegebenen Banden konnten nur teilweise reproduziert werden.

Abschließend ist festzustellen, daß mit den derzeit gültigen Arzneibuchvorschriften ein eindeutiger Identitätsnachweis für die enthaltenen *Echinacea*-Arten nicht geführt werden kann.

Ein besserer Identitätsnachweis könnte durch die von uns entwickelten DC-Trennsysteme nach Anreicherung der Extrakte (s.Kap.8.2.5.3.) erfolgen, wobei für jede Droge jeweils ein DC-Fingerprint der Kaffeesäurederivate (Laufmittel DC-T1) und der lipophilen Inhaltsstoffe (Laufmittel DC-T2) auszuführen wäre. Als DC-Leitsubstanzen für *Echinacea purpurea* könnten Cichoriensäure und 2-Caffeoyl-weinsäure (hydrophiler Bereich) sowie die 2,4-Dienalkylamide (lipophiler Bereich) dienen. Für *Echinacea angustifolia* wären Echinacosid und Cynarin (hydrophiler Bereich) und 2-Monoenalkylamide (lipophiler Bereich) typisch, während bei *Echinacea pallida* die Anwesenheit von Cichoriensäure, 2-Caffeoyl-weinsäure und Echinacosid (hydrophiler Bereich) sowie der 2-Ketoalkine und 2-Ketoalkene (lipophiler Bereich) zu prüfen wäre.

5.7. Stabilitätsuntersuchungen

Da für die in Frage kommenden Wirksubstanzen aus *Echinacea*-Drogen die Frage der Stabilität in den verschiedenen Stufen der Herstellung und Lagerung von Bedeutung ist, stellten wir diesbezügliche Untersuchungen an.

Bei den lipophilen Verbindungen konnten wir feststellen, daß die Alkylamide in gelösten Extrakten über mehrere Monate stabil sind. In den getrockneten Drogen war in einigen Chargen ein Abbau der Amide nach 1-2jähriger Lagerung zu erkennen.

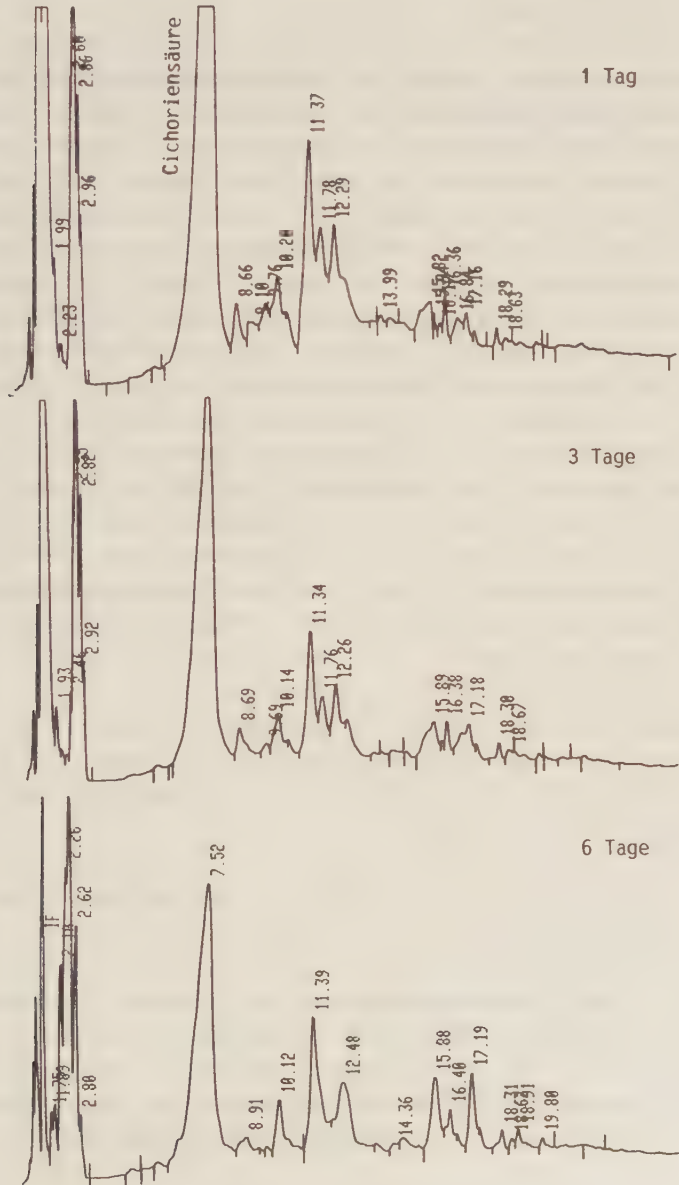
Ebenso blieb das Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1-ol in den Urtinkturen auch nach einjähriger Lagerung bei Raumtemperatur unverändert. In den getrockneten Herba-Drogen konnte es jedoch vermutlich aufgrund seiner hohen Flüchtigkeit nicht mehr nachgewiesen werden.

Bei den hydrophilen Inhaltsstoffen stellten wir fest, daß durch die Trocknung der Droge kein Abbau der Kaffeesäurederivate stattfand. In alkoholischen Extrakten aus getrockneten Drogen war nach mehrwöchiger Lagerung bei Raumtemperatur eine Bildung von Artefakten zu beobachten. Im Laufmittel DC-T1 waren oberhalb der Cichoriensäure deutliche Banden sichtbar, die im genuinen Extrakt nicht vorkamen. Die Bildung von Estern der Carbonsäuren durch das Lösungsmittel ist hier eine mögliche Ursache.

Bei vergleichenden Untersuchungen stellten wir fest, daß die HPLC-Chromatogramme der hydrophilen Inhaltsstoffe der Urtinkturen der drei Echinacea-Arten ein verändertes Bild zeigten gegenüber den entsprechenden Chromatogrammen der getrockneten Drogen. Es wurde daher untersucht, inwieweit sich die hydrophilen Inhaltsstoffe während der zehn Tage dauernden Mazeration bei der Herstellung der Urtinktur von *E. purpurea* verändern. Aus einem Ansatz wurde dazu nach einer Stunde, einem Tag, drei Tagen, sechs Tagen und zehn Tagen das Inhaltsstoffmuster durch HPLC überprüft. Abbildung 101 zeigt, daß der Gehalt der anfangs als Hauptkomponente vorliegenden Cichoriensäure ständig abnimmt und daß bereits sechs Tage nach dem Ansetzen der Urtinktur nur noch ein Bruchteil der Ausgangskonzentration nachweisbar ist. Wurde dagegen eine nach einem Tag abfiltrierte Probe nach zehn Tagen erneut untersucht, so war kein quantitativer Unterschied im HPLC-Chromatogramm gegenüber dem ersten Tag festzustellen, wodurch Lösungsmittelleffekte auszuschließen waren. Aufgrund dieser Untersuchungen kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Kaffeesäurederivate bei wäßriger oder wäßrig-alkoholischer Extraktion aus frischer Droge enzymatisch verändert werden. Dabei spielt offensichtlich die Methode der Extrakterstellung und die Vorbehandlung der Droge eine wichtige Rolle, da in einigen Urtinktur-Fertigpräparaten keine Umlagerung feststellbar war, und im Preßsaftpräparat andere Umlagerungsprodukte aufgefunden wurden.

Die Identifizierung der dabei entstehenden Produkte und mögliche Einflüsse auf Wirkung und Wirksamkeit muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Abb.101 : HPLC-Trennung der hydrophilen Fraktion der Ur­tinktur aus *E. purpurea*
(1, 3 und 6 Tage nach dem Ansetzen der Ur­tinktur; Trennsystem HPLC-T1)



6. Pharmakologische Untersuchungen

6.1. Bisherige immunologische Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten und -präparaten

Bereits 1915 konnte UNRUH [101] eine Leukozyten-Stimulierung bei Tuberkulosekranken durch Gabe eines Echinacea angustifolia-Extraktes feststellen. Eine gesteigerte Phagozytose-Aktivität im Tierversuch nach Anwendung von Echinacin^R (Preßsaft aus dem frischen Kraut von *E. purpurea*) wurde später auch von KÜHN [102], BITTNER [103] und CHONE [104] beobachtet. In einer neueren Untersuchung von ENBERGS und WOESTMANN [105] wurde über eine deutliche Erhöhung der Chemolumineszenz von Leukozyten nach Gabe von Echinacin^R im Tierversuch berichtet. Ebenfalls als Stimulierung der körpereigenen Abwehrmechanismen werteten BÜSING und THÜRIGEN [106] einen signifikanten Anstieg des Properdin-Spiegels, der nach i.v.-Injektion von Echinacin^R bei Kaninchen beobachtet wurde.

Als mitverantwortlich für eine Erhöhung der Abwehrkräfte bei Infektionen wird eine lokale Beeinflussung der Geweberesistenz durch Echinacin^R betrachtet, welche von BÜSING [107] im Dekapsulationstest an Streptokokken, sowie von KOCH und HAASE [108] im Spreading-Test an der Ratte nachgewiesen werden konnte. Dabei wird die körpereigene sowie die von Bakterien gebildete Hyaluronidase gehemmt, wodurch das Eindringen von Infektionserregern in Zelloberflächen und die Ausbreitung einer Infektion eingeschränkt wird.

Eine in-vitro-antivirale Wirkung für Extrakte aus *E. purpurea* und *E. angustifolia* wurde von WACKER und HILBIG [109], ORINDA [110] sowie EILMES [111] beobachtet, wobei jedoch die Zellkulturen erst nach vorhergehender Inkubation mit dem Extrakt virusresistent wurden.

Bei Probandenversuchen stellte MÖSE [112] eine gesteigerte Phagozytose-Aktivität von Granulozyten fest.

Weitere immunologische Untersuchungen mit Echinacea-Extrakten, durchgeführt teils als in-vitro-Versuche, teils als Tierversuche finden sich in der Literatur.

Die Beurteilung der vorliegenden Untersuchungen ist dadurch erschwert, daß in keinem Fall chemisch standardisierte Extrakte vorgelegen hatten, was jedoch für

eine sinnvolle Bewertung unbedingt zu fordern ist. Außerdem war es bisher nicht möglich, die beobachtete Stimulierung der körpereigenen Abwehrmechanismen einer Inhaltsstoffklasse oder einem einzelnen Bestandteil zuzuordnen.

Zur Klärung dieser Fragen wurde im folgenden versucht, die Wirkung von Echinacea-Extrakten mit bekanntem Inhaltsstoffmuster in verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Testsystemen zu reproduzieren und eine Korrelation zwischen Wirkung und Inhaltsstoffen zu finden.

6.2. Beschreibung der verwendeten Testsysteme

6.2.1. Granulozyten-Ausstrichtest nach BRANDT

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen stellen die wichtigsten Effektorzellen der Phagozytose dar und besitzen somit große Bedeutung in der Infektabwehr. Die Phagozytoseleistung der Granulozyten kann in-vitro mit einer modifizierten Methodik nach BRANDT [113] gemessen werden.

Dabei wird eine aus Humanblut angereicherte, auf eine bestimmte Zellzahl eingestellte Granulozytenfraktion mit Hefezellen und der Testsubstanz inkubiert. Anschließend werden die Ansätze auf Objektträger ausgestrichen, angefärbt und die Anzahl der phagozytierten Hefepartikel mikroskopisch bestimmt. Der Phagozytoseindex entspricht der mittleren Anzahl phagozytierter Hefezellen pro Granulozyt. Die Beeinflussung der Phagozytoseaktivität errechnet sich als die prozentuale Abweichung des Phagozytoseindex der getesteten Substanz im Vergleich zur Kontrolle.

6.2.2. Chemolumineszenz-Test

Eine weitere Anordnung zur in-vitro-Messung der Phagozytoseleistung stellt der Chemolumineszenz-Test dar. Er beruht auf der Erscheinung, daß Phagozyten während der Phagozytose nach Stimulierung aktivierte Sauerstoffmoleküle freisetzen. Diese oxidieren zugesetzte Verbindungen, wobei Licht bestimmter Wellenlänge erzeugt wird. Diese Lichtemission, die als Chemolumineszenz bezeichnet wird, kann durch Photonen-zählung mit Hilfe von Photomultipliern quantifiziert werden und stellt somit ein Maß für die Phagozytoseaktivität der Zellen dar.

Als phagozytierende Zellen verwendeten wir eine gereinigte Granulozytenfraktion. Zymosan wurde als Fremdschubstanz und Luminol zur Steigerung der Lichtemission zugesetzt. Die prozentuale Angabe der Phagozytosesteigerung durch die zu testende Substanz wird auf einen Blindwert bezogen.

6.2.3. Carbon-Clearance-Test nach BIOZZI

Der von BIOZZI [114] entwickelte Carbon-Clearance-Test bietet die Möglichkeit, die in-vivo-Phagozytose-Aktivität von Makrophagen zu bestimmen. Dazu werden einem Mäusekollektiv, dem zuvor die Testsubstanz über zwei Tage peroral verabreicht wurde, gelatinestabilisierte Kohlepartikel intravenös injiziert. Danach wird nach 3, 6, 9, 12 und 15 min Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen und die Kohleelimination photometrisch bestimmt.

Aus den Extinktionswerten kann die lineare Regression der Kohleelimination bestimmt werden, wobei der Regressionskoeffizient RC die Steigung der ermittelten Gerade ($\log E/t$) angibt. Die Phagozytoseaktivität ergibt sich aus dem Verhältnis der Regressionskoeffizienten der mit der zu untersuchenden Substanz behandelten Gruppe von Tieren (RC_{tr}) zu denen einer unbehandelten Kontrollgruppe (RC_c). Ist das Verhältnis kleiner als 1,5, so handelt es sich um eine schwache Wirkung (DSK-Note = 1); ist das Verhältnis größer als 1,5, so kann die phagozytosesteigernde Wirkung als gut beurteilt werden (DSK-Note = 2).

6.3. Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen

Im in-vitro-Granulozyten-Ausstrichtest zeigten die Ethanol-Gesamtextrakte aus den Wurzeln von *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia*, die sowohl die hydrophilen als auch die lipophilen Bestandteile enthalten, eine deutliche Wirksamkeit im Konzentrationsbereich von 10^{-2} bis 10^{-4} mg/ml Testansatz. Die Phagozytose wurde im Vergleich zur Kontrolle um 17 - 33 % gesteigert. Nach einer weiteren Fraktionierung der Ethanolextrakte in eine wasserlösliche und eine chloroformlösliche Fraktion war feststellbar, daß die Chloroform-Fractionen der Ethanolextrakte eine stärkere Wirkung zeigten als die hydrophilen Auszüge. Lediglich bei *E. purpurea* erreichte die wäßrige Fraktion eine hohe Stimulierung von 40 % (Tab.6) [115].

Im in-vivo-Test wurde die Carbon-Clearance-Rate durch den Ethanol-Gesamtextrakt von *E. purpurea* etwa um das Dreifache erhöht ($RC_{tr}/RC_c = 3,1$) bzw. bei *E. angustifolia* etwa um das Zweifache ($RC_{tr}/RC_c = 1,7$) (Abb.102). Die Ergebnisse korrelierten gut mit den in-vitro-Resultaten des Granulozyten-Ausstrichtests, da auch hier nach einer weiteren Fraktionierung die Chloroformfraktionen wirksamer waren als die wasserlöslichen Fraktionen, wobei bei *E. purpurea* wiederum eine deutliche Restaktivität der Wasserfraktion zu beobachten war ($RC_{tr}/RC_c = 1,9$) (Tab.7) [115].

Aus diesen Untersuchungsergebnissen konnten wir schließen, daß die immunologischen Wirkprinzipien der Wurzeln von *E. angustifolia* vorwiegend im lipophilen Anteil lokalisiert sind. Im Falle von *E. purpurea* sollten wirksame Verbindungen sowohl in der lipophilen als auch in der wäßrigen Fraktion enthalten sein.

Tab.6(1) : Ergebnisse des Granulozyten-Ausstrichtests mit den ethanolischen *Echinacea purpurea*-Wurzelextrakten und den daraus hergestellten wäßrigen und chloroformlöslichen Fraktionen [115]

Substanz	Konz.(%)	PI	Stim.PI(%)
Kontrolle		2,78	
E. purp. radix	10^{-2}	2,71	- 1 ^a
Ethanolgesamtextrakt	10^{-3}	3,24	+17
	10^{-4}	3,70	+33
	10^{-5}	3,44	+24
	10^{-6}	3,23	+17
	10^{-7}	3,10	+12
Kontrolle		2,78	
E. purp. radix	10^{-2}	2,74	- 1
wäßrige Fraktion	10^{-3}	3,12	+12
	10^{-4}	3,96	+42
	10^{-5}	3,40	+22
	10^{-6}	3,34	+19
	10^{-7}	3,01	+ 8
Kontrolle		2,94	
E. purp. radix	10^{-2}	2,63	- 5 ^b
CHCl₃-Fraktion	10^{-3}	3,59	+22
	10^{-4}	4,04	+37
	10^{-5}	3,70	+26
	10^{-6}	3,31	+13
	10^{-7}	3,09	+ 5

a) Bezogen auf Kontrolle mit Ethanol (PI = 2,74)

b) Bezogen auf Kontrolle mit Ethanol (PI = 2,78)

Tab.6(2): Ergebnisse des Granulozyten-Ausstrichtests mit den ethanolischen Echinacea angustifolia-Wurzelextrakten und den daraus hergestellten wäßrigen und chloroformlöslichen Fraktionen [115]

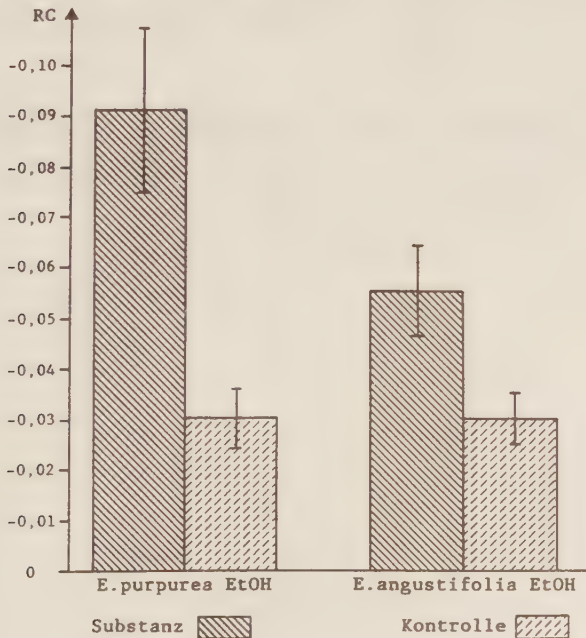
Substanz	Konz.(%)	PI	Stim.PI(%)
Kontrolle		1,67	
E. ang. radix	10^{-2}	1,70	+13 ^c
Ethanolgesamtextrakt	10^{-3}	1,96	+17
	10^{-4}	1,82	+9
	10^{-5}	1,78	+7
	10^{-6}	1,68	0
	10^{-7}	1,66	0
Kontrolle		3,72	
E. ang. radix	10^{-2}	3,93	+6
wäßrige Fraktion	10^{-3}	4,35	+17
	10^{-4}	3,86	+4
	10^{-5}	3,49	-6
	10^{-6}	3,77	+1
	10^{-7}	3,41	-10
Kontrolle		2,94	
E. ang. radix	10^{-2}	2,62	-6 ^b
CHCl₃-Fraktion	10^{-3}	3,46	+18
	10^{-4}	3,94	+34
	10^{-5}	3,80	+29
	10^{-6}	3,40	+16
	10^{-7}	2,81	-4

b) Bezogen auf Kontrolle mit Ethanol (PI = 2,78)
c) Bezogen auf Kontrolle mit Ethanol (PI = 1,54)

Tab.7: Ergebnisse des Carbon-Clearance-Tests mit Echinacea-Wurzelextrakten ($\pm$ Standardabweichung; n= 9-15) [115]

Substanz	RCtr	RCc	RCtr/RCc	DSK-Note
E.purpurea Ethanoextrakt	0,091 $\pm$ 0,017	0,030 $\pm$ 0,006	3,1	2
E.angustifol. Ethanoextrakt	0,055 $\pm$ 0,009	0,030 $\pm$ 0,005	1,7	2
E.purpurea Wasserfraktion	0,065 $\pm$ 0,004	0,036 $\pm$ 0,006	1,9	2

Abb.102: Carbon-Clearance durch Echinacea-Wurzelextrakte (Regressionskoeffizienten RC der Kohleelimination (log E gegen t) im Vergleich zur Kontrolle)



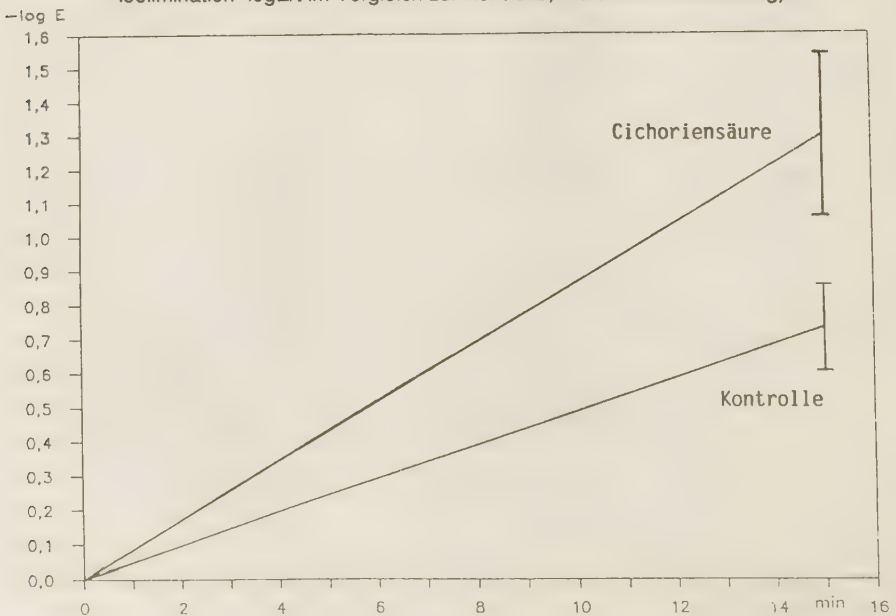
6.3.1. Testung der Inhaltsstoffe der hydrophilen Fraktion

Die vorwiegend in der wäßrigen Fraktion enthaltene Cichoriensäure zeigte im Granulozyten-Ausstrichtest eine deutliche Steigerung der Phagozytoseaktivität. Im Konzentrationsbereich von 10^{-4} bis 10^{-7} mg/ml Testansatz konnte eine signifikante Stimulierung bis zu 46 % gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen wiesen eine deutlich verminderte Aktivität auf (Tab.8).

Im Chemolumineszenz-Test konnte ebenfalls im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-6} mg/ml eine deutliche Stimulierung bis zu 44 % für Cichoriensäure festgestellt werden (Tab.9). Eine gute Steigerung der Phagozytoseaktivität wurde auch im Carbon-Clearance-Test beobachtet. Bei einer Konzentration von 5 mg Cichoriensäure in 30 ml Testansatz betrug das Verhältnis der Regressionskoeffizienten RC_{tr}/RC_c 2,1 (DSK-Note = 2) (Abb.103, Tab.10). Die Ergebnisse der in-vitro- und in-vivo-Testmodelle korrelierten somit gut miteinander.

Weitere getestete hydrophile Echinacea-Inhaltsstoffe (Echinacosid, Verbascosid und 2-Caffeoyl-weinsäure) zeigten in unseren Testanordnungen keine signifikante Erhöhung der Phagozytoserate.

Abb.103: Carbon-Clearance-Test mit Cichoriensäure (5 mg/30 ml; Verlauf der Kohleelimination $-\log E/t$ im Vergleich zur Kontrolle; $\pm$ Standardabweichung)



Tab.8: Ergebnisse des Granulozyten-Ausstrichtests für Cichoriensäure

Substanz	Konz.(mg/ml)	PI Kontr.	PI Subst.	Stim.PI (%)
Cichorien-säure				
1.Testung	10^{-3}	3,10	3,35	+ 8
	10^{-4}	3,10	3,80	+23
	10^{-5}	3,10	4,42	+43
	10^{-6}	3,10	4,34	+40
2.Testung	10^{-3}	2,29	2,03	-11
	10^{-4}	2,29	2,99	+30
	10^{-5}	2,29	3,36	+46
	10^{-6}	2,29	2,45	+ 6
3.Testung	10^{-4}	3,20	3,58	+12
	10^{-5}	3,20	3,47	+ 8
	10^{-6}	3,20	3,87	+21
	10^{-7}	3,20	4,27	+33

Tab.9 : Ergebnisse des Chemolumineszenz-Tests für Cichoriensäure

Substanz	Konz.(mg/ml)	Stim.(+)/Suppr.(-)
Cichoriensäure		
1. Testung	10^{-5}	+27
	10^{-6}	+27
2. Testung	10^{-4}	+14
	10^{-5}	+21
	10^{-6}	+33
3.Testung	10^{-3}	+12
	10^{-4}	+27
	10^{-5}	+44
	10^{-6}	+24

Tab.10 : Ergebnisse des Carbon-Clearance-Tests ($\pm$ Standardabweichung; n = 8-13)

Substanz	RC _{tr}	RC _c	RC _{tr} /RC _c	DSK-Note
Cichoriensäure (0,1mg/10 ml)	0,052 $\pm$ 0,016	0,049 $\pm$ 0,008	1,3	1
(5,0mg/10 ml)	0,087 $\pm$ 0,016	0,049 $\pm$ 0,008	2,1	2
E. purp. radix Alkylamidfrakt. (1mg/10 ml)	0,046 $\pm$ 0,009	0,037 $\pm$ 0,011	1,4	1
(10mg/10 ml)	0,054 $\pm$ 0,022	0,037 $\pm$ 0,011	1,6	2
(20mg/10 ml)	0,067 $\pm$ 0,007	0,039 $\pm$ 0,006	1,7	2
E.angust. radix Alkylamidfrakt. (20mg/10ml)	0,058 $\pm$ 0,004	0,039 $\pm$ 0,006	1,5	2

6.3.2. Testung der Inhaltsstoffe der lipophilen Fraktion

Die Testung einer durch HPLC standardisierten, gereinigten Alkylamid-Fraktion aus *E. purpureae* radix zeigte im Carbon-Clearance-Test bei p.o.-Applikation ein Verhältnis der Regressionskoeffizienten RC_{tr}/RC_c von 1,7 (DSK-Note = 2), was einer guten Steigerung der in-vivo-Phagozytoserate gegenüber der Kontrolle entspricht (Abb.104, 106, Tab.10).

Die entsprechende Alkylamid-Fraktion aus *E. angustifoliae* radix, die andere Amide enthält als *E. purpurea* (s. Kap.5), wies ebenfalls eine gute Stimulierung der Phagozytose auf (RC_{tr}/RC_c = 1,5; DSK-Note = 2) (Abb. 105, 106, Tab.10).

Der Sesquiterpenalkohol Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1ß-ol zeigte keine Steigerung der in-vitro-Phagozytose im Granulozyten-Ausstrichtest.

Abb.104 : Carbon-Clearance-Test mit der Alkylamid-Fraktion aus *E. purpureae* radix (20 mg/10ml; Verlauf der Kohleelimination $-\log E/t$ im Vergleich zur Kontrolle; $\pm$ Standardabweichung)

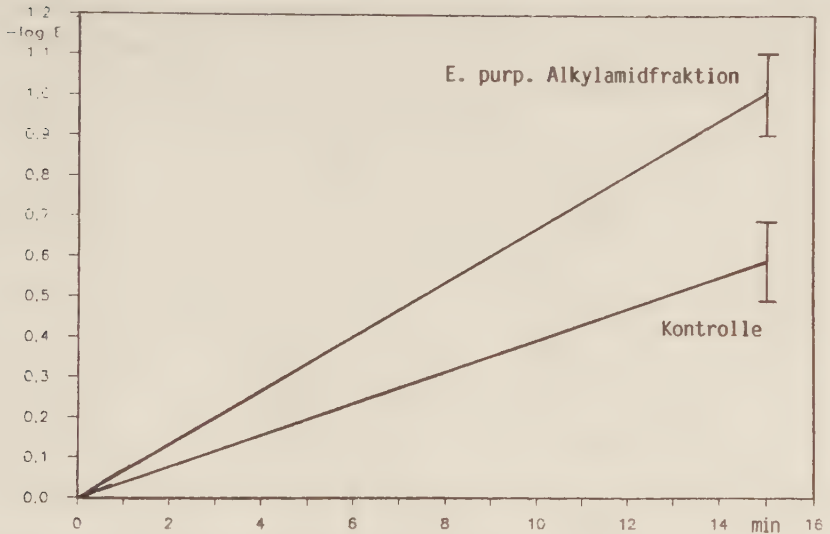


Abb.105 : Carbon-Clearance-Test mit der Alkylamid-Fraktion aus *E. angustifoliae* radix (20 mg/10 ml; Verlauf der Kohleelimination $-\log E/t$ im Vergleich zur Kontrolle; $\pm$ Standardabweichung)

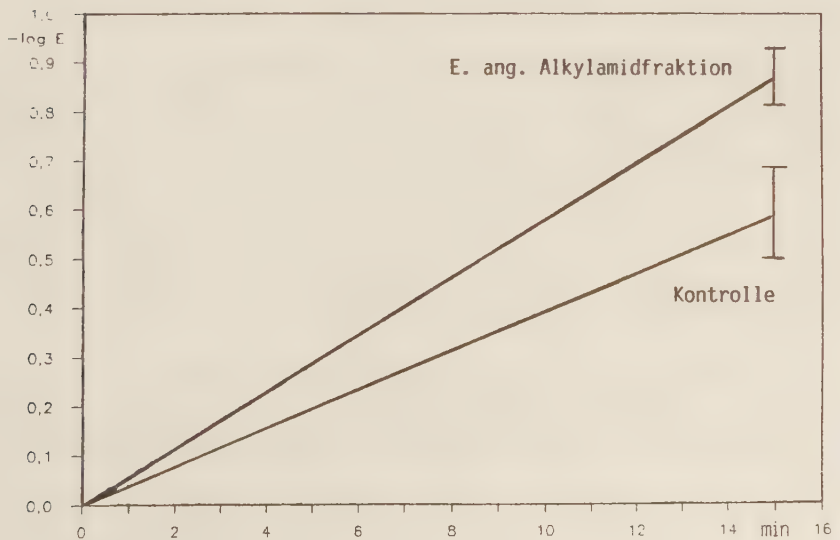
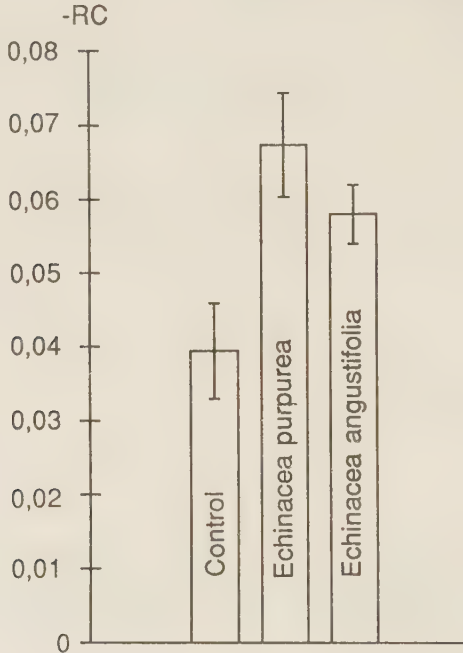


Abb.106 : Carbon-Clearance durch Alkylamid-Fractionen aus *E. purpureae* radix und *E. angustifoliae* radix (Regressionskoeffizienten RC der Kohleelimination ($\log E$ gegen t) im Vergleich zur Kontrolle; $\pm$ Standardabweichungen)



Bei *Echinacea angustifolia* liegt das Ausmaß der in-vivo-Phagozytosesteigerung der Alkylamidfraktion ($RC_{tr}/RC_c = 1,5$) somit im Bereich der Stimulierung des Ethanolgesamtextraktes ($RC_{tr}/RC_c = 1,7$). Aufgrund dieser guten Korrelation ist anzunehmen, daß für die o.a. phagozytosesteigernden Wirkungen vorwiegend die lipophilen Alkylamide verantwortlich sind. Bei *Echinacea purpurea* ist die immunologische Aktivität auf die hydrophile und die lipophile Fraktion verteilt, wobei die einzelnen Stimulierungsraten gegenüber der Aktivität des Gesamtextraktes niedriger lagen. Eine Potenzierung der Wirkung durch die einzelnen Inhaltsstoffe ist zu diskutieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das immunologische Wirkprinzip in *Echinacea* offensichtlich auf mehrere Inhaltsstoffklassen verteilt ist. In unseren Untersuchungen konnten immunologische Wirkungen in in-vivo- und in-vitro-Versuchen eindeutig

bestimmten Inhaltsstoffen zugeordnet werden. Neben den von PROKSCH und WAGNER [2-4] isolierten immunologisch aktiven hochmolekularen Polysacchariden konnten wir im niedermolekularen Bereich für Cichoriensäure in unseren Testmodellen eine signifikante phagozytosesteigernde Wirkung nachweisen. Im lipophilen Bereich konnten für *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia* die Alkylamide als wirksame Fraktion lokalisiert werden, wobei die Klärung genauer Struktur-Wirkungsbeziehungen weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben muß.

7. Zusammenfassung

- I. Aus *Echinaceae purpureae radix* wurden nach Anreicherung der hydrophilen Inhaltsstoffe Cichoriensäure (2,3-Dicaffeoyl-weinsäure) und die bisher in der Gattung *Echinacea* nicht beschriebene 2-Caffeoyl-weinsäure isoliert. Außerdem konnten in *Echinacea angustifolia* neben Echinacosid die Kaffeesäurederivate Chlorogensäure, Isochlorogensäuren, Cynarin und Verbascosid erstmals aufgefunden werden. Rutin wurde in beiden *Echinacea*-Arten nachgewiesen. Die Strukturen wurden durch chromatographische und spektroskopische Methoden (UV, IR, MS, $^1\text{H-NMR}$) bestätigt.
- II. Aus dem Hexanextrakt von *Echinaceae purpureae radix* wurden zehn Alkylamide, aus *Echinaceae angustifoliae radix* weitere 13 Alkylamide isoliert.

Die Strukturaufklärung der Verbindungen erfolgte durch UV-, IR-, MS, $^1\text{H-NMR}$ - und COSY-NMR-Spektroskopie sowie durch Doppelresonanzexperimente, wobei 11 der Substanzen neue Alkylamide darstellen.

Neben dem hauptsächlich vorkommenden Strukturtyp der Isobutylamide konnten auch Verbindungen von 2-Methyl-butylamid-Typ aufgefunden werden. Die mengenmäßig dominierenden Amide in beiden Wurzeldrogen sind die 10E/Z-Isomeren des Dodeca-2E,4E,8Z,10-tetraensäure-isobutylamids. Es konnte gezeigt werden, daß sich die weiteren Alkylamide von *E. purpureae* und *E. angustifoliae radix* hauptsächlich dadurch unterscheiden, daß in *E. purpureae radix* 2,4-Dienamide vorherrschen, während in *E. angustifoliae radix* vorwiegend 2-Monoenamide enthalten sind. Die Säurereste besitzen überwiegend eine 8,10-Diin-Struktur oder stellen hydrierte Derivate davon dar. Einige Säurereste weisen eine Doppelbindung in Allylstellung zur Diin-Gruppe auf.

Es wurden folgende Alkylamide isoliert :

Echinaceae purpureae radix

- Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4E,8Z,10E-tetraensäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4E,8Z,10Z-tetraensäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid
- Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid
- Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid
- Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid

Echinaceae angustifoliae radix

- Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid
- Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid
- Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid
- Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid
- Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid
- Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid
- Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid

- III. Aus den frischen oberirdischen Teilen von *Echinacea purpurea* wurde das Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1ß-ol, ein bisher in der Gattung *Echinacea* noch nicht beschriebener Sesquiterpenalkohol isoliert. Die Struktur wurde durch UV-, IR-, MS, ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR-Spektroskopie sowie durch zweidimensionale ^1H - ^1H - und ^1H - ^{13}C -Korrelations-Spektroskopie und NOE-Experimenten aufgeklärt.

- IV. Es wurden HPLC-Trennsysteme entwickelt, die für die einzelnen Echinacea-Arten und -drogenteile charakteristische Fingerprints liefern. Wie unsere Untersuchungen mit über 100 Drogenmustern von *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* und *E. pallida* ergaben, weisen die Inhaltsstoffmuster der drei Echinacea-Arten sowohl im hydrophilen als auch im lipophilen Bereich deutliche Unterschiede auf. Somit ist eine eindeutige Möglichkeit der Unterscheidung von *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* gegeben.

Hydrophile Inhaltsstoffe

Die Wurzeln und das Kraut von *Echinacea purpurea* enthalten Cichoriensäure als Hauptinhaltsstoff. Daneben ist in beiden Teilen 2-Caffeoyl-weinsäure enthalten. Im Kraut von *Echinacea pallida* sind neben Cichoriensäure zusätzlich Isochlorogensäuren enthalten, während die Wurzeln Echinacosid als Hauptkomponente führen. In *Echinacea angustifolia* ist Cichoriensäure nicht oder nur in Spuren vorhanden. Das Kraut von *E. angustifolia* enthält Isochlorogensäuren, die Wurzeln Echinacosid als Hauptbestandteil. Im Gegensatz zu *E. pallida* radix weisen die Wurzeln von *E. angustifolia* jedoch zusätzlich Cynarin auf.

Lipophile Inhaltsstoffe

Die oberirdischen Teile aller drei Echinacea-Arten enthalten ein sehr ähnliches Muster an Isobutylamiden vom 2,4-Dienamid-Typ. Demgegenüber weisen die Wurzeln charakteristische Unterschiede auf. *E. purpureae* radix enthält zusätzliche Amide vom 2,4-Dienamid-Typ, wogegen in *E. angustifoliae* radix Alkylamide vom 2-Monoenamid-Typ vorherrschen. In den Wurzeln von *E. pallida* fehlen Alkylamide meist, während 2-Ketoalkin- und 2-Ketoalken-Verbindungen die lipophile Hauptfraktion darstellen.

Der Gehalt an Cichoriensäure und der mengenmäßig dominierenden Dodecatetraensäure-isobutylamide wurde in den einzelnen Pflanzenteilen mittels HPLC bestimmt.

Nach unseren Untersuchungsergebnissen müssen die Analysenvorschriften der Echinacea-Monographien der derzeit gültigen Arzneibücher korrigiert werden.

Durch die entwickelten Trennsysteme konnten auch Echinacea-Fertigpräparate analysiert werden. Dabei zeigte sich, daß *Echinacea angustifolia* mit *Echinacea pallida* verwechselt wird.

Stabilitätsuntersuchungen ergaben, daß die Kaffeesäurederivate bei wäßriger oder wäßrig-alkoholischer Extraktion aus frischen Echinacea-Drogen vermutlich durch enzymatischen Einfluß abgebaut werden. Extrakte aus getrockneten Drogen sind dagegen relativ stabil.

- V. Durch immunologische Untersuchungen im Granulozyten-Ausstrichtest und im Carbon-Clearance-Test wurden die immunstimulierend wirksamen Fraktionen lokalisiert. Es zeigte sich, daß in *Echinacea angustifolia* vorwiegend die lipophile Fraktion eine phagozytosesteigernde Wirkung besitzt, während in *Echinacea purpurea* wirksame Verbindungen sowohl in der hydrophilen als auch in der lipophilen Fraktion enthalten sind.

Die in-vitro- und in-vivo-Testung der einzelnen Substanzen im Granulozyten-Ausstrichtest, im Chemolumineszenz-Test und im Carbon-Clearance-Test bewies im Bereich der hydrophilen Inhaltsstoffe von *Echinacea purpurea* eine signifikante Steigerung der Phagozytoseaktivität durch Cichoriensäure. Im lipophilen Bereich konnten in *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia* die Alkylamide als eine immunologisch wirksame Inhaltsstoffklasse bestimmt werden.

8. Experimenteller Teil

8.1. Herkunft der Drogen und Vergleichssubstanzen

Handelsmuster verschiedener Echinacea-Drogen wurden von mehreren deutschen Droghandlungen bezogen. Authentische Muster von *Echinacea purpurea*, *Echinacea angustifolia* und *Echinacea pallida* erhielten wir von Prof. R. McGregor, University of Kansas, Lawrence, USA, Dr. G. Heubl, Institut für Systematische Botanik der Universität München, U. Bomme, Bayer. Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, S. Foster, Berryville, USA, L. Johnson, Trout Lake Farm, Washington, USA, D. Richter, Wyandotte, USA, Dr. B. Davis, Phytotherapy Res. Lab., Los Angeles, USA, Dr. E. Alstat, Eclectic Institute, Portland, USA, sowie von den Firmen Vogel & Weber, Inning am Ammersee, Spagyros SA, Boncourt, Schweiz, DHU, Karlsruhe, Lomapharm, Emmetal und Madaus, Köln. Belegexemplare liegen im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Vergleichssubstanzen :

-Cichoriensäure :	Prof. Dr. K. Herrmann, Institut für Lebensmittelchemie, Hannover, und Prof. Dr. C. Andary, Faculte de Pharmacie, Montpellier, Frankreich.
-2-Caffeoyl-weinsäure :	Prof. Dr. V.L. Singleton, University of California, Davis, USA
-Chlorogensäure :	Fa. Roth, Karlsruhe
-Echinacosid :	Prof. Dr. O. Sticher, ETH Zürich
-Verbascosid :	Prof. Dr. C. Andary, Faculte de Pharmacie, Montpellier, Frankreich und Dr. C. Chapple, University of Guelph, USA
-Isochlorogensäuren :	Fa. Roth, Karlsruhe
-Cynarin :	Fa. Roth, Karlsruhe
-Rutin :	Fa. Roth, Karlsruhe

8.2. Chromatographische Arbeitsmethoden

8.2.1. Dünnschichtchromatographie

Adsorbentien

- Analytische DC: Kieselgel 60 F254-Fertigplatten 20x20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Fa. Merck, Darmstadt.
Kieselgel 60 F254-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC), 10 x10 cm, Fa. Merck, Darmstadt.
- Präparative DC: Kieselgel 60 F254-Fertigplatten 20x20 cm, Schichtdicke 0,5 mm, Fa. Merck, Darmstadt. Die Platten wurden zweimal mit MeOH p.A. vorentwickelt.

Laufmittelsysteme

- DC-T1 : Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure-Wasser (5:100:10:10) (Trennung der Kaffeesäurederivate)
- DC-T2 : Hexan-Ethylacetat (2:1)
(Trennung der Alkylamide und des Sesquiterpenalkohols)
- DC-T3 : Ethylacetat-Ameisensäure-Wasser (67:13:20)
(Laufmittel des DAB 9 zum Identitätsnachweis von *Echinacea angustifoliae radix*)
- DC-T4 : Cyclohexan-Ether-Methanol (70:20:10)
(Laufmittel des HAB 1 zum Identitätsnachweis von *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia*)
- DC-T5 : Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)
(Trennung der Zucker nach Hydrolyse der Caffeoxyglykoside)

Detektionsmittel

-Naturstoffreagenz/Polyethylenglykol (für Pflanzensäuren und Flavonoide):

Es wird nacheinander mit einer 0,1 %igen methanolischen Lösung von Diphenylboryloxyethylamin und einer 5%igen ethanolischen Polyethylenglykol-4000-Lösung besprüht. Die Platte wird im UV 365 nm betrachtet. Die maximale Farbintensität wird erst nach etwa 30 min erreicht.

-Eisen(III)-chlorid-Reagenz (für phenolische Verbindungen)

10% wäßrige Lösung. Auswertung im VIS.

-Ammoniak (für azide Verbindungen)

Bedampfen der Platte mit Ammoniak 25% . Auswertung im VIS.

-Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz (für Alkylamide und den Sesquiterpenalkohol)

0,5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig, 85 ml Methanol und 5 ml konz. Schwefelsäure gemischt. Nach dem Besprühen wird die Platte ca. 5 min. bei 100°C im Trockenschrank erhitzt. Auswertung im VIS.

-Komarowsky-Reagenz (für Zucker nach Hydrolyse)

1 ml einer 50 %igen ethanolschen Schwefelsäure und 10 ml einer 2 %igen methanolschen 4-Hydroxybenzaldehydlösung werden vor Gebrauch gemischt. Die Platte wird 5-10 min bei 100°C im Trockenschrank erwärmt. Auswertung im VIS.

Mikrohydrolyse der Caffeoxyglykoside auf der DC-Platte nach zweidimensionaler Entwicklung

Etwa 20 µl eines Methanolextraktes aus dem Kraut von *E. angustifolia* wurde in der rechten unteren Ecke der DC-Fertigplatte punktförmig aufgetragen. Die erste Entwicklung erfolgte im Laufmittel DC-T1. Die aufgetrennten Substanzen wurden durch Fluoreszenzminderung im UV 254 nm detektiert und durch Bedampfen mit konzentrierter HCl (30 min/100°C ; DC-Kammer in einem Trockenschrank, danach abföhen) hydrolysiert. Am oberen Teil der DC-Platte wurden nun die Zucker-Vergleichssubstanzen aufgetragen. Die zweite Entwicklung nach Drehen der Platte um 90° im Laufmittel DC-T5 trennte die abgespaltenen Zucker auf. Die Detektion erfolgte mit Komarowsky-Reagenz.

8.2.2. SäulenchromatographieAdsorbens:

Kieselgel 60, Korngröße kleiner als 0,063 mm, Fa. Merck, Darmstadt.

Pack- und Verfahrenstechnik:

Das Kieselgel wurde mit dem Elutionsmittel auf dem Magnetrührer etwa eine Stunde zu einer gleichmäßigen, luftblasenfreien Suspension gerührt. Die Masse wurde dann in die schräggestellte Säule, die etwas Elutionsmittel enthielt, zügig und luftblasenfrei gegossen. Nach dem Aufrichten der Säule wurde der Hahn geöffnet und mit dem Elutionsmittel so lange gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb. Das Substanzgemisch wurde in möglichst konzentrierter Lösung im Eluens mit einer Pasteurpipette aufgetragen. Mit Hilfe eines in das Elutionsmittel eintauchenden Scheidetrichters, der das Lösungsmittel enthielt und an den ein leichter Unterdruck angelegt worden war, wurde die Elutionsmit-

telmenge über der Säule konstant gehalten. Das Eluat wurde mit einem Fraktionsschneider in Fraktionen zu 20 ml aufgefangen.

8.2.3. Flash-Chromatographie

Das Packen der Säule sowie das Auftragen des Extraktes erfolgte in der unter 8.2.2. angegebenen Weise. Im Gegensatz zur normalen Säulenchromatographie wurde jedoch über ein Ventil mit Stickstoff ein Überdruck von etwa 2 bar angelegt. Über der Säule befand sich ein über ein Schraubgewinde angebrachtes Lösungsmittelreservoir. Der Flow wurde auf 2-3 ml/min eingestellt, die Fraktionen betrugen 20 ml.

8.2.4. Mitteldruckflüssigchromatographie (MPLC)

Säule : Büchi B 685, 46x2,6 cm i.D.
 Pumpe : Gilson Modell 303
 Adsorbens: C8-Reversed phase Material
 Polygosil 60-2540 C8, Korngröße 25-40 μm ,
 Fa. Macherey & Nagel, Düren
 Durchfluß: 10 ml/min
 Einspritzmenge : max. 5 ml
 Fraktionen : 20 ml

8.2.5. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

8.2.5.1. Analytische HPLC

HP 1090 Liquid Chromatograph mit HP 1040 A Photodiodenarray-Detektor, kombiniert mit HP 85B Tischcomputer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470 A Plotter (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn).

Säule : Hibar 125-4 mit LiChrospher 100 CH-18/2, 5 μm (Fa. Merck, Darmstadt)
 Vorsäule : LiChroCART 4-4 mit LiChrospher 100 CH-18/2, 5 μm (Fa. Merck, Darmstadt)
 Durchfluß: 1,0 ml/min
 Einspritzmenge : max. 25 μl

Trennsysteme

HPLC-T1 : für Kaffeesäurederivate

A = Wasser + 1% (V/V) 0,1 N Phosphorsäure

B = Acetonitril + 1% (V/V) 0,1 N Phosphorsäure

Gradient: 5-25 % B linear in 20 min,

25 % isokratisch bis 25 min

Detektion: UV 330 nm

HPLC-T2 : für Alkylamide aus *E. purpurea*

A = Wasser

B = Acetonitril

40-60 % linear in 30 min

Detektion: UV 254 nm

HPLC-T3 : für Alkylamide aus *E. angustifoliae* radix und *E. purpureae* radix,
Polyacetylene aus *E. pallidae* radix und für den Sesquiterpenalkohol
aus den Urtinkturen der drei Echinacea-Arten

A = Wasser

B = Acetonitril

40-80 % B linear in 30 min

Detektion: UV 210 nm

HPLC-T4 : für Alkylamide aus dem Kraut von *E. purp.*, *E. angust.* und *E. pall.*
wie HPLC-T3, jedoch Detektion: UV 254 nm

Als Fließmittel für die analytische HPLC wurden ausschließlich Lösungsmittel in ChromAr-Qualität (Fa. Promochem, Wesel) verwendet. Das Wasser war destilliert. Die Laufmittel wurden mit Helium entgast.

8.2.5.2. Semipräparative HPLC

Pumpen: Perkin Elmer Serie 3B

Einspritzteil: U6K (Waters GmbH)

Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer

Säule: Hibar 250-10 mit LiChrosorb RP-18, 7 µm (Fa. Merck, Darmstadt)

Vorsäule: Guard-Pak, Bondapak C18, (Fa. Waters)

Durchfluß: 3-4 ml/min

Einspritzmenge: 50-200 µl

Laufmittel: je nach Retentionszeit der zu isolierenden Substanz 40 %, 50 %, 60 %
oder 70 % Acetonitril in Wasser, isokratisch

Detektion: UV 210, 240 oder 260 nm

8.2.5.3. Probenvorbereitung

Es wurden nur partikelfreie Lösungen injiziert. Falls erforderlich wurde durch ein Millex-HV4 0,45 µm Filter (Millipore, Eschborn) filtriert.

Urtinkturen

Die Urtinkturen von *Echinacea purpurea* und *Echinacea angustifolia* wurden nach den Vorschriften des HAB 1 angefertigt. Die Urtinktur von *Echinacea pallida* stellten wir entsprechend der Vorschrift von *E. angustifolia* her. Die Lösungen wurden direkt für die HPLC verwendet.

Hydrophile Fraktionen der Herba-Drogen

Zur Entfernung der lipophilen Bestandteile wurden die Herba-Drogen (1,0 g) zunächst mit 50 ml Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die Droge mit 50 ml Methanol p.A. am Soxhlet eine Stunde extrahiert und der Extrakt am Rotationsverdampfer bei 40° C schonend zur Trockne eingeeengt. Er wurde dann in 10,00 ml Methanol p.A. gelöst.

Lipophile Fraktionen der Herba-Drogen

1,0 g pulverisierte Herba-Droge wurde mit 50 ml Chloroform p.A. eine Stunde in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der Extrakt wurde am Rotationsverdampfer bei 40° C schonend zur Trockne eingeeengt. Um Chlorophyll abzutrennen und die Inhaltsstoffe anzureichern, wurde der Extrakt in 25 ml Methanol gelöst bzw. suspendiert und anschließend mit 25 ml 5%iger Bleiacetatlösung versetzt. Der Niederschlag wurde durch Kieselgur (Celite^R) abfiltriert. Das Filtrat wurde mit Chloroform p.A. erschöpfend ausgeschüttelt und die Chloroformphasen über Natriumsulfat getrocknet. Letztere wurden am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt und der Rückstand in 1,0 ml Ethanol p.A. gelöst.

Fertigpräparate

Zur Anreicherung der Inhaltsstoffe von flüssigen Fertigpräparaten wurden 30 ml mit je 30 ml Chloroform p.A. dreimal ausgeschüttelt.

- a) Die vereinigten lipophilen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 0,5 ml Ethanol p.A. aufgenommen und 5 µl der Lösung (evtl. filtrieren) zur Trennung der lipophilen Bestandteile in die HPLC eingespritzt.
- b) Die wäßrige Phase wurde mit 2N HCl auf pH 3 angesäuert und dreimal mit je

30 ml Ethylacetat p.A. ausgeschüttelt. Die getrockneten Ethylacetatphasen wurden eingengt, der Rückstand in 1,0 ml Methanol p.A. gelöst und 1 µl der klaren Lösung zur HPLC eingespritzt.

8.3. Spektroskopische und physikalische Methoden

Schmelzpunkte

Kofler-Heizbank, Fa. Reichert, Wien.

Die Werte sind unkorrigiert angegeben.

UV-Spektren

- 550 SE UV/VIS Spektrophotometer, Fa. Perkin Elmer
- Photodiodenarray-Detektor HP 1040 A, Fa. Hewlett Packard, Waldbronn (on-line-Aufnahme während der HPLC-Trennung)

IR-Spektren

Acculab-1 Spektrophotometer, Fa. Beckmann

(Preßling 1 mg/100 mg KBr oder 1 mg der öligen Substanz auf einen KBr-Preßling aufgetropft)

Massenspektren

- | | |
|-----------------|--|
| - EI-MS, CI-MS: | - Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos |
| | - Varian MAT 44 S |
| - FAB-MS : | - Massenspektrometer MS 80 RFA, Fa. Kratos |
| | FAB-Quelle: Xenon, 7-8 kV, 10 W, |
| | Matrix: Glycerin |
| | - Massenspektrometer MS 50 RF, Fa. Kratos |
| | FAB-Quelle: Xenon 6-8 kV, Matrix: Glycerin |
| | Hochauflösung durch "peak-matching" |

¹H-NMR-Spektren

Kernresonanzspektrometer WP-80 (80 MHz), Fa. Bruker

Kernresonanzspektrometer AM-300 (300 MHz), Fa. Bruker

Kernresonanzspektrometer AM-360 (360 MHz), Fa. Bruker

Kernresonanzspektrometer AM-500 (500 MHz), Fa. Bruker

^{13}C -NMR-Spektren

Kernresonanzspektrometer AM-300 (300 MHz), Fa. Bruker

 ^1H - ^1H - und ^1H - ^{13}C -Korrelationsspektren

Kernresonanzspektrometer AM-300 (300 MHz), Fa. Bruker

Kernresonanzspektrometer AM-360 (360 MHz), Fa. Bruker

Kernresonanzspektrometer AM-500 (500 MHz), Fa. Bruker

NOE-Experimente

Kernresonanzspektrometer AM 300 (300 MHz), Fa. Bruker

Optische Drehung

Polarimeter LEP A 2, Fa. Zeiss

8.4. Isolierungen8.4.1. Isolierung von Cichoriensäure und 2-Caffeoyl-weinsäure

1,8 kg gepulverte Wurzeldroge von *Echinacea purpurea* wurden in einer Soxhlet-Apparatur mit n-Hexan erschöpfend extrahiert. Der Extrakt wurde zur Isolierung der lipophilen Alkylamide verwendet (s. 8.4.2.). Nach dem Trocknen der Droge wurde erneut durch Soxhletextraktion ein Methanolextrakt hergestellt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verblieb 337 g brauner, zähflüssiger Extrakt. Dieser wurde in MeOH 50% gelöst, mit 2N HCl auf pH 3 angesäuert und anschließend mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach dem Trocknen der organischen Phase mit Natriumsulfat und Abdampfen des Lösungsmittels verblieb ein brauner Rückstand (152 g), der die Phenole in angereicherter Form enthält. Die weitere Auftrennung erfolgte durch Mitteldruckflüssigchromatographie.

Mitteldruckflüssigchromatographie

Säule : 46 x 2,6 cm i.D.

Stationäre Phase : RP-8-Material (Polygosil 60-2540 C8, Korngröße 25-40 μm , Fa. Macherey & Nagel, Düren)

Eluens : Acetonitril-Wasser 10:90 + 1% (V/V) 0,1 N Phosphorsäure; isokratisch; nach 40 min Erhöhung des Acetonitrilanteils auf 15%

Detektion : DC der Fraktionen im Laufmittel DC-T1

Durchfluß : 10 ml/min

Fractionen : 20 ml

Die Fractionen 20-40 enthielten 2-Caffeoyl-weinsäure, die Fractionen 90-120 Cichoriensäure in chromatographisch reiner Form.

Zur Abtrennung der Phosphorsäure aus dem Eluat wurden die vereinigten Fractionen 20-40 und 90-120 jeweils am Rotationsverdampfer vom Acetonitril befreit. Die wäßrig-phosphorsauren Lösungen wurden anschließend jeweils auf eine kleine Säule aufgebracht (20x2 cm i.D.), die mit RP-8-Material gepackt und mit Wasser äquilibriert war. Durch Anlegen eines schwachen Überdruckes wurde zunächst die wäßrige Fraction eluiert und anschließend mit Wasser nachgespült. Am Säulenauslauf wurde der pH-Wert des Eluats mit pH-Papier überprüft. Nach der Elution der Phosphorsäure wurden die Kaffeesäurederivate mit Acetonitril 50% von der Säule gespült und aufgefangen. Nach schonendem Abdampfen des Acetonitrilanteils wurden die wäßrigen Lösungen gefriergetrocknet. Es verblieben 410 mg Cichoriensäure und 250 mg 2-Caffeoyl-weinsäure jeweils als gelbliches Pulver.

8.4.2. Isolierung der Alkylamide aus Echinaceae purpureae radix

1,8 kg frisch pulverisierte Wurzeln von *E. purpurea* wurden mit n-Hexan 3 Tage in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels verbleibende braune Rückstand (12,4 g = 0,7 %) wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Laufmittel: Hexan-Ethylacetat 3:1; Säule 45x6,5 cm i.D.; Durchfluß 1 ml/min; Fractionen zu 20 ml) fraktioniert. Die erhaltenen Fractionen wurden durch DC im Laufmittel DC-T2 untersucht und inhaltsgleiche Fractionen vereinigt. Die weitere Auftrennung erfolgte durch die MPLC.

Mitteldruckflüssigchromatographie

Säule : 46 x 2,6 cm i.D.
 Stationäre Phase : RP-8-Material (Polygosil 60-2540 C8, Korngröße 25-40 µm, Fa. Macherey & Nagel, Düren)
 Eluens : Acetonitril-Wasser 40:60, 50:50 oder 60:40; isokratisch
 Durchfluß : 10 ml/min
 Detektion : DC der Fractionen im Laufmittel DC-T2; HPLC im Trennsystem HPLC-T2
 Fractionen : 20 ml

Die Verbindungen P6 und P7 wurden als Reinsubstanzen eluiert. Sie wurden mit n-Hexan ausgeschüttelt. Aus den eingeeengten Hexanlösungen fielen in der Kälte jeweils weiße Nadeln aus (P6: 23 mg; P7: 60 mg). Die weiteren Alkylamide wurden durch semipräparative HPLC gereinigt.

Semipräparative HPLC

Säule : 250 x 10 mm i.D.
 Stationäre Phase: RP-18-Material (LiChrosorb RP-18, 7 µm, Fa. Merck, Darmstadt)
 Eluens : Acetonitril-Wasser 40:60 bis 55:45, isokratisch
 Detektion : UV 260 nm
 Durchfluß : 3-4 ml/min

Die aufgefängenen Lösungen der Peaks wurden mit n-Hexan ausgeschüttelt. Es wurden 10 mg P1 (weiße Nadeln aus Hexan), 8 mg P2 (farbloses Öl), 8 mg P3 (weiße Nadeln aus Hexan), 3 mg P4 (farbloses Öl), 5 mg P5 (farbloses Öl), 2 mg P8 (farbloses Öl) und 5 mg P9 (farbloses Öl) als Reinsubstanzen gewonnen.

8.4.3. Isolierung der Alkylamide aus Echinaceae angustifoliae radix

300 g frisch pulverisierte Wurzeln von Echinacea angustifolia wurden mit n-Hexan 3 Tage in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der gelbliche Rückstand (8,7 g = 2,9 %) wurde durch Flash-Chromatographie an Kieselgel fraktioniert (Säule 45 x 6,5 cm i.D.; Laufmittel: Hexan-Ethylacetat 5:1; Durchfluß 1 ml/min; Fraktionen zu 20 ml). Die weitere Auftrennung der Fraktionen erfolgte durch semipräparative HPLC.

Semipräparative HPLC

Säule : 250 x 10 mm i.D.
 Stationäre Phase : RP-18-Material (LiChrosorb RP-18, 7 µm, Fa. Merck, Darmstadt)
 Eluens : Acetonitril-Wasser 40:60 bis 75:25; isokratisch
 Detektion : UV 210 nm
 Durchfluß : 3-4 ml/min

Die aufgefängenen Lösungen wurden mit n-Hexan ausgeschüttelt. Es wurden 9 mg A1 (farblose Nadeln aus Hexan), 7 mg A2 (farblose Nadeln aus Hexan), 2 mg A3 (farbloses Öl), 4 mg A4 (farbloses Öl), 2 mg A5 (farbloses Öl), 4 mg A6 (farbloses Öl), 30 mg A7 (farbloses Öl), 2 mg A9 (farbloses Öl), 30 mg A10 (farbloses Öl) sowie 3

mg A11 (=P1; farbloses Öl), 2 mg A12 (=P6; farbloses Öl), 4 mg A13 (=P3; farbloses Öl) und 4 mg A14 (=P2; farbloses Öl) als Reinsubstanzen gewonnen.

8.4.4. Isolierung des Germacrenalkohols

Aus 950 g frischer, oberirdischer Teile von *Echinacea purpurea* wurde nach der Vorschrift des HAB 1 eine Urtinktur hergestellt. Durch Zusatz einer 5 %igen Bleiacetatlösung wurden phenolische Inhaltsstoffe und Chlorophyll ausgefällt. Der Niederschlag wurde über Kieselgur (Celite^R) abfiltriert und das Filtrat mit Chloroform ausgeschüttelt. Der angereicherte Extrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Säule: 30 x 5 cm i.D.; Eluens: Hexan-Ethylacetat 4:1; Durchfluß: 0,6 ml/min; Fraktionen zu 20 ml) fraktioniert und die einzelnen Fraktionen durch DC im LM DC-T2 detektiert. Die Abtrennung von Verunreinigungen erfolgte durch semipräparative HPLC (Säule: 250 x 10 mm i.D.; LiChrosorb RP-18, 7 µ; Eluens: Acetonitril-Wasser 55:45, isokratisch; Detektion: UV 240 nm; Durchfluß: 4 ml/min). Nach Ausschütteln der aufgefundenen Peakfraktionen mit n-Hexan wurden 40 mg von S1 als farbloses Öl in reiner Form erhalten.

8.5. Quantitative Bestimmungen

8.5.1. Gehaltsbestimmung der Cichoriensäure

Als Eichlösung diente eine Lösung von 1,88 mg Cichoriensäure in 10,00 ml Methanol. Die Eichgerade zeigte Linearität nach Höhenintegration im Bereich von 0,4 bis 2,8 µg Cichoriensäure. Trennsystem: HPLC-T1

Probenvorbereitung

Die pulverisierten Drogen (1,0 g) wurden zunächst mit 50 ml Chloroform in einer Soxhlet-Apparatur eine Stunde entfettet und anschließend mit 50 ml Methanol extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer schonend zur Trockne eingeeengt und in 10,00 ml Methanol p.A. gelöst.

μl	Peakhöhe	μg Cichoriensäure
2	5 509 207	0,376
3	11 508 777	0,564
5	22 380 935	0,940
7	34 328 125	1,316
9	49 273 128	1,692
11	60 734 597	2,068
13	71 558 974	2,444
15	81 392 857	2,820

Korrelationskoeffizient: 0,99897

Geradengleichung: $y = -6,434178 + 5,971693x$

Herkunft der einzelnen Chargen

1. Echinacea purpurea-Blüten:
 1. Charge: Fa. Vogel & Weber
 2. Charge: Fa. Spagyros SA
 3. Charge: Botan.Garten, München
2. Echinacea purpurea-Blätter:
 1. Charge: Fa. Vogel & Weber
 2. Charge: Fa. Spagyros SA
 3. Charge: Fa. Vogel & Weber
3. Echinacea purpurea-Stengel:
 1. Charge: Fa. Vogel & Weber
 2. Charge: Fa. Vogel & Weber
 3. Charge: Fa. Spagyros SA
4. Echinacea purpurea-Wurzeln:
 1. Charge: Fa. Vogel & Weber
 2. Charge: Fa. Madaus
 3. Charge: Fa. Christof Peter
5. Echinacea pallida-Blüten:
 1. Charge: Fa. Spagyros SA
 2. Charge: Fa. Galke
 3. Charge: Fa. Galke
6. Echinacea pallida-Blätter:
 1. Charge: Fa. Spagyros SA
 2. Charge: Fa. DHU
 3. Charge: Botan.Garten, München
7. Echinacea pallida-Stengel:
 1. Charge: Fa. Spagyros SA
 2. Charge: Botan.Garten, München
 3. Charge: Baumannshof, Forstwiesen
8. Echinacea pallida-Wurzeln:
 1. Charge: Fa. Madaus

2. Charge: Fa. Spagyros SA
 3. Charge: Fa. Carroux
9. Echinacea angustifolia-Blüten:
 1.+2. Charge: Fa. Spagyros SA
10. Echinacea angustifolia-Blätter:
 1.+2. Charge: Fa. Spagyros SA
11. Echinacea angustifolia-Stängel:
 1.+2. Charge: Fa. Spagyros SA
12. Echinacea angustifolia-Wurzeln:
 1. Charge: Fa. Interdrogas
 2. Charge: Fa. Galke
 3. Charge: Fa. Spagyros SA

Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode: rel. Standardabweichung max. 5,4 %
 Reproduzierbarkeit der Extraktbereitung: Abweichungen $\pm 0,1\%$ absolut

8.5.2. Gehaltsbestimmung der Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamide

Eichlösung: 1,5 mg Dodecatetraensäureamide in 10,00 ml Ethanol

Eichgerade: Linearität nach Flächenintegration im Bereich von 0,23 bis 1,95 μg
 Referenzsubstanz.

Trennsystem: HPLC-T2

μl	Peakfläche	μg Amid
1,5	2 852 900	0,225
3	5 737 000	0,450
4	7 711 400	0,600
6	11 687 700	0,900
8	15 567 800	1,200
10	19 606 400	1,500
13	25 427 000	1,950

Korrelationskoeffizient: 0,9999

Geradengleichung: $y = -0,1362086 + 1,9679925x$

Probenvorbereitung

Die Chloroformextrakte (5,0 g Droge/50 ml CHCl_3) wurden schonend zur Trockne eingengt und in 10,00 ml Ethanol p.A. gelöst.

Herkunft der einzelnen Chargen:

1. Echinacea purpurea-Kraut:

Chargen 1,3 und 4: L. Johnson, Trout Lake Farm, Washington, USA

Charge 2: Baumannshof, Forstwiesen

2. Echinacea purpurea-Wurzeln:

Charge 1: Fa. Vogel & Weber

Charge 2: Trout Lake Farm

Charge 3: Baumannshof, Forstwiesen

Charge 4: Baumannshof, Forstwiesen

Charge 5: Fa. Madaus

Charge 6: Fa. Spagyros SA

3. Echinacea pallida-Kraut:

Charge 1: Fa. Madaus

Charge 2: Fa. Christof Peter

Charge 3: Baumannshof, Forstwiesen

Charge 4: Fa. DHU

4. Echinacea angustifolia-Kraut:

Charge 1+2: D. Richter, USA

Charge 3: Fa. Spagyros SA

5. Echinacea angustifolia-Wurzeln:

Charge 1: S. Foster, Kansas, USA

Charge 2: Fa. Wilcox, USA

Charge 3: S. Foster, Kansas, USA

Charge 4: Fa. Spagyros SA

Charge 5: R. McGregor, USA

8.6. Aufstellung der untersuchten Fertigpräparate

Präparat 1: Esberitox N^R, Fa. Schaper&Brümmer, Salzgitter
Chargen-Nr. 80 54 53

Zusammensetzung: 10 ml enthalten

Herb. Thujae occid. rec. (Perkolat 1=5)	0,5 ml
Rad. Baptisiae tinct. (Perkolat 1=5)	1,0 ml
Rad. Echinaceae (angust. et purpur. 1+1) (Perkolat 1=10)	1,5 ml

Präparat 2: Nedasan^R, Fa. Neda, Sauerlach
Chargen-Nr. 7167

Zusammensetzung: 100 g enthalten

	Echinacea purp. Urtinktur	50,0 g
	Eupatorium perfol. D3	1,7 g
	Thuja	1,2 g
Präparat 3:	Echinacea purpurea Urtinktur, Fa. DHU, Karlsruhe	
	Chargen-Nr. 31831	
Präparat 4:	Echinacea angustifolia Urtinktur, Fa. DHU, Karlsruhe	
	Chargen-Nr. 15861	
Präparat 5:	Echinacin ^R liquidum, Fa. Madaus, Köln	
	Chargen-Nr. 61 03 56	
	Zusammensetzung: 100 g enthalten 80,0 g Preßsaft aus Herba recens	
	Echinaceae purpureae	

8.7. Physikalische Daten

1. Cichoriensäure (2,3-Dicaffeoyl-weinsäure, Verb. H1)

Gelbliches Pulver; $C_{22}H_{18}O_{12}$

Smp.: 200°C (Zersetzung)

DC : $R_f = 0,75$ (DC-T1)

HPLC : $R_t = 8$ min (HPLC-T1)

UV : $\lambda_{\max}$ (Acetonitril/Wasser): 325, 300 (sh), 217 nm.

IR : KBr; $\nu = 3400, 1725, 1700, 1600, 1515, 1385, 1260, 1150, 975, 850, 810$
 cm^{-1} .

FAB-MS : Glycerin-Matrix; Negativionenendetektion m/z (rel. Int.): 473 (26) $[M-H]^-$, 405 (16), 339 (11), 325 (12), 311 (17), 293 (8), 221 (4), 205 (3), 137 (3), 109 (3). Hochauflösung: gef. 473,07205; ber. 473,07202

1H -NMR : 80 MHz, DMSO- d_6 + TFA- d , TMS int. Stand., δ (ppm) =
7,60 (d, 2H, AB-System B-Teil, $J = 15$ Hz, H- β)
7,17 (s, 2H, H-2')
7,10 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-6')
6,82 (d, 2H, $J = 8$ Hz, H-5')
6,43 (d, 2H, AB-System A-Teil, $J = 15$ Hz, H- α)
5,75 (s, 2H, H-2, H-3)

Optische Drehung:

$[\alpha]_D^{20} = -368,6^\circ$ ($c = 0,3$; Methanol)

2. 2-Caffeoyl-weinsäure (Verb. H₂)

Gelbliches Pulver; C₁₃H₁₂O₉

Smp. : 130°C (Zersetzung)

DC : R_f = 0,45 (DC-T1)

HPLC : R_t = 2,5 min (HPLC-T1)

UV : $\lambda_{\max}$ (Acetonitril/Wasser): 325, 300 (sh), 217 nm.

IR : KBr; ν = 3400, 1700, 1600, 1515, 1385, 1260, 1150, 1050, 975, 850, 810 cm⁻¹.

FAB-MS : Glycerin-Matrix; Negativionendetektion m/z (rel. Int.): 311 (14) [M-H]⁻, 219 (5), 175 (12), 149 (10), 71 (19), 59 (43). Positivionendetektion (unter Zusatz von LiCl) m/z (rel. Int.): 319 (37) [M+Li]⁺, 250 (22), 217 (84), 200 (32), 169 (35).

¹H-NMR : 80 MHz, DMSO-d₆ + TFA-d, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 7,60 (d, 1H, AB-System B-Teil, J = 15 Hz, H- β)
 7,17 (s, 1H, H-2')
 7,10 (d, 1H, J = 8 Hz, H-6')
 6,82 (d, 1H, J = 8 Hz, H-5')
 6,43 (d, 1H, AB-System A-Teil, J = 15 Hz, H- α)
 5,43 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H-2)
 4,68 (d, 1H, J = 2,2 Hz, H-3)

Optische Drehung:

$$[\alpha]_D^{20} = -21,4^\circ \text{ (c = 0,2; Methanol)}$$

3. Undeca-2Z,4E-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P6)

Weißes Pulver aus n-Hexan; C₁₅H₁₉NO

Smp. : 59-60°C

DC : R_f = 0,46 (DC-T2)

HPLC : R_t = 8,8 min (HPLC-T3)

UV : $\lambda_{\max}$ (Ethanol): 257 nm (ϵ = 19.300)

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1650, 1550 (-CO-NH-); 2900 (CH); 2220 (H-C $\equiv$ C); 1005, 970 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 229 (52) [M]⁺, 214 (9) [M-CH₃]⁺, 186 (13) [M-C₃H₇]⁺, 166 (82) [C₁₀H₁₆NO]⁺, 157 (65) [M-C₄H₁₀N]⁺, 152 (83) [C₉H₁₄NO]⁺, 128 (100) [M-C₅H₁₁NO]⁺, 115 (52) [M-C₉H₆]⁺, 110 (55), 96 (47), 77

(35), 66 (80), 57 (78) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 41 (76).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,53 (d, 1H, $J = 11$ Hz, H-2), 6,38 (dd, 1H, $J = 11; 11$ Hz, H-3), 7,51
 (dd, 1H, $J = 15; 11$ Hz, H-4), 5,98 (dt, 1H, $J = 15; 7$ Hz, H-5), 2,40 (m,
 4H, H-6, H-7), 1,98 (s, 1H, H-11), 5,60 (br s, 1H, NH-), 3,14 (dd, 2H,
 $J = 7; 7$ Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

4. Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P1)

Weißer Nadeln aus n-Hexan; $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}$

Smp. : 61°C

DC : $R_f = 0,16$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 7,4$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 259 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1670, 1540$ (-CO-NH-); 2900 (CH); 2220 (H-C $\equiv$ C-); 1630, 1000 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 229 (29) $[\text{M}]^+$, 214 (5) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 186 (5) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$,
 167 (38) $[\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}]^+$, 157 (100) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$, 128 (22) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}]^+$,
 95 (33), 66 (55), 57 (92) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 43 (91) $[\text{C}_3\text{H}_7]^+$.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,88 (d, 1H, $J = 15$ Hz, H-2), 7,49 (dd, 1H, $J = 15; 11$ Hz, H-3), 6,17
 (dd, 1H, $J = 11; 11$ Hz, H-4), 5,84 (dt, 1H, $J = 11; 8$ Hz, H-5), 2,55 (dt,
 2H, $J = 7; 7$ Hz, H-6), 2,38 (dt, 2H, $J = 7; 1$ Hz, H-7), 1,98 (t, 1H, $J =$
 1 Hz, H-11), 5,60 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, $J = 7; 7$ Hz, H-1'),
 1,81 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

5. Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. P3)

Weißer Nadeln aus n-Hexan; $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}$

Smp. : 74°C

DC : $R_f = 0,25$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 9,1$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 260 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1660, 1550$ (-CO-NH-); 2900 (CH); 1620, 990
 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 243 (100) $[\text{M}]^+$, 228 (13) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 215 (17), 200 (13)

$[M-C_3H_7]^+$, 186 (20) $[M-C_4H_9]^+$, 171 (23) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 143 (27) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 128 (37) $[M-C_6H_{13}NO]^+$, 115 (30) $[M-C_{10}H_8]^+$, 77 (18), 67 (18), 57 (22) $[C_4H_9]^+$, 43 (17) $[C_3H_7]^+$, 41 (19).

1H -NMR : 360 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,86 (d, 1H, J= 15 Hz, H-2), 7,50 (dd, 1H, J= 15; 11 Hz, H-3), 6,15 (dd, 1H, J= 11; 11 Hz, H-4), 5,85 (dt, 1H, J= 11; 8 Hz, H-5), 2,52 (dt, 2H, J= 7; 7 Hz, H-6), 2,36 (t, 2H, J= 7 Hz, H-7), 1,90 (s, 3H, H-12), 5,56 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, J= 7; 7 Hz, H-1'), 1,81 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, J= 7 Hz, H-3', H-4').

6. Dodeca-2E,4E,10E-trien-8-insäure-isobutylamid (Verb. P8)

Farbloses Öl; $C_{16}H_{23}NO$

DC : Rf = 0,49 (DC-T2)

HPLC : Rt = 10,3 min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 232 (sh), 261 nm

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1660, 1550 (-CO-NH-); 2900 (CH); 1630, 995 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 245 (37) $[M]^+$, 230 (12) $[M-CH_3]^+$, 202 (7) $[M-C_3H_7]^+$, 188 (15) $[M-C_4H_9]^+$, 173 (30) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 167 (38) $[C_{10}H_{17}NO]^+$, 145 (100) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 129 (53), 115 (83) $[M-C_{10}H_{10}]^+$, 110 (45), 104 (57).

1H -NMR : 500 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,79 (d, 1H, J= 15 Hz, H-2), 7,20 (dd, 1H, J= 15; 11 Hz, H-3), 6,22 (dd, 1H, J= 15; 11 Hz, H-4), 6,15 (dt, 1H, J= 15; 7 Hz, H-5), 2,50 (dt, 2H, J= 7; 7 Hz, H-6), 2,42 (dt, 2H, J= 7; 7 Hz, H-7), 5,45 (dq, 1H, J= 15; 1 Hz, H-10), 5,88 (m, 1H, H-11), 1,83 (dd, 3H, J= 6; 1 Hz, H-12), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, J= 7; 7 Hz, H-1'), 1,81 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, J= 7 Hz, H-3', H-4').

7. Dodeca-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraensäure-isobutylamid (Verb. P7)

Weißer Nadeln aus Hexan; $C_{16}H_{25}NO$

Smp. : 70°C (1:1-Gemisch)

DC : Rf = 0,48 (DC-T2)

HPLC : Rt = 13,5 min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Hexan): 231 (ϵ = 24.000), 260 (ϵ = 28.500) nm

IR : KBr; ν = 3300, 3100, 1660, 1550 (-CO-NH-); 2930 (CH); 1635, 1000, 950 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 247 (45) $[M]^+$, 232 (5) $[M-CH_3]^+$, 175 (12) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 167 (90) $[C_{10}H_{17}NO]^+$, 152 (33), 147 (13) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 128 (44) $[C_7H_{14}NO]^+$, 115 (63) $[M-C_{10}H_{12}]^+$, 94 (44), 81 (100) $[C_6H_9]^+$, 66 (75), 57 (76) $[C_4H_9]^+$, 41 (77).

1H -NMR : 360 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =

a) 10E-Isomer:

5,76 (d, 1H, J = 15 Hz, H-2), 7,18 (dd, 1H, J = 15; 10 Hz, H-3), 6,17 (dd, 1H, J = 15; 11 Hz, H-4), 6,10 (dt, 1H, J = 15; 7 Hz, H-5), 2,28 (m, 4H, H-6, H-7), 5,25 (dt, 1H, J = 11; 7 Hz, H-8), 5,97 (dd, 1H, J = 11; 11 Hz, H-9), 6,32 (dd, 1H, J = 15; 11 Hz, H-10), 5,69 (m, 1H, H-11), 1,76 (dd, 3H, J = 7; 1 Hz, H-12), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,16 (dd, 2H, J = 7; 7 Hz, H-1'), 1,76 (m, 1H, H-2'), 0,92 (d, 6H, J = 7 Hz, H-3', H-4').

b) 10Z-Isomer:

5,76 (d, 1H, J = 15 Hz, H-2), 7,18 (dd, 1H, J = 15; 10 Hz, H-3), 6,17 (dd, 1H, J = 15; 11 Hz, H-4), 6,10 (dt, 1H, J = 15; 7 Hz, H-5), 2,28 (m, 4H, H-6, H-7), 5,43 (dt, 1H, J = 11; 7 Hz, H-8), 6,30 (dd, 1H, J = 11; 11 Hz, H-9), 6,26 (dd, 1H, J = 11, 7 Hz, H-10), 5,55 (m, 1H, H-11), 1,75 (dd, 3H, J = 7; 1 Hz, H-12), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,16 (dd, 2H, J = 7; 7 Hz, H-1'), 1,76 (m, 1H, H-2'), 0,92 (d, 6H, J = 7 Hz, H-3', H-4').

8. Dodeca-2E,4E,8Z-triensäure-isobutylamid (Verb. P9)

Farbloses Öl; $C_{16}H_{27}NO$

DC : R_f = 0,57 (DC-T2)

HPLC : R_t = 16,0 min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 259 nm

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1660, 1550 (-CO-NH-); 2920 (CH); 1630, 995 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 249 (32) $[M]^+$, 234 (5) $[M-CH_3]^+$, 220 (6), 206 (9) $[M-C_3H_7]^+$, 181 (32), 177 (100) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 167 (95) $[C_{10}H_{17}NO]^+$, 152 (57), 149 (60) $[M-C_5H_{10}]^+$, 115 (38) $[M-C_{10}H_{14}]^+$, 110 (92).

1H -NMR : 360 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =

5,76 (d, 1H, J = 15 Hz, H-2), 7,19 (dd, 1H, J = 15; 10 Hz, H-3), 6,15

(dd, 1H, J= 15; 11 Hz, H-4), 6,10 (dt, 1H, J= 15; 7 Hz, H-5), 2,18 (m, 4H, H-6, H-7), 5,35 (m, 2H, H-8, H-9), 2,00 (dt, 2H, J= 7; 7 Hz, H-10), 1,37 (m, 2H, H-11), 0,90 (t, 3H, J= 7 Hz, H-12), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,17 (dd, 2H, J= 7; 7 Hz, H-1'), 1,78 (m, 1H, H-2'), 0,92 (d, 6H, J= 7 Hz, H-3', H-4').

9. Undeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verb. P4)

Farbloses Öl; $C_{16}H_{21}NO$

DC : Rf = 0,33 (DC-T2)

HPLC : Rt = 9,4 min (HPLC-T3)

UV : $\lambda_{\max}$ (Acetonitril/Wasser): 261 nm

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1660, 1550 (-CO-NH-); 2950 (CH); 2290, 2220 (H-C $\equiv$ C-); 1620, 990, 960 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 243 (15) $[M]^+$, 242 (21), 228 (8) $[M-CH_3]^+$, 214 (4), 186 (10) $[M-C_4H_9]^+$, 172 (13) $[M-C_5H_{11}]^+$, 157 (33) $[M-C_5H_{12}N]^+$, 128 (100) $[M-C_6H_{13}NO]^+$, 115 (14), 110 (14).

1H -NMR : 500 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
5,88 (d, 1H, J= 15 Hz, H-2), 7,49 (dd, 1H, J= 15; 11 Hz, H-3), 6,17 (dd, 1H, J= 11; 11 Hz, H-4), 5,82 (dt, 1H, J= 11; 8 Hz, H-5), 2,55 (dt, 2H, J= 7; 7 Hz, H-6), 2,37 (t, 2H, J= 7 Hz, H-7), 1,97 (s, 1H, H-11), 5,56 (br s, 1H, NH-), 3,23 (m, 2H, H-1'), 1,58 (m, 1H, H-2'), 1,41 (m, 1H, H-3a'), 1,17 (m, 1H, H-3b'), 0,92 (t, 3H, J= 7 Hz, H-4'), 0,92 (d, 3H, J= 7 Hz, H-5').

10. Dodeca-2E,4Z-dien-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verb. P5)

Farbloses Öl; $C_{17}H_{23}NO$

DC : Rf = 0,39 (DC-T2)

HPLC : Rt = 11,4 min (HPLC-T3)

UV : $\lambda_{\max}$ (Acetonitril/Wasser): 261 nm

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1660, 1550 (-CO-NH-); 2920 (CH); 1640, 990, 960 (C=C).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 256 (100) $[M-1]^+$, 242 (20) $[M-CH_3]^+$, 228 (16), 213 (25), 199 (15), 185 (28), 171 (23) $[M-C_5H_{12}N]^+$, 149 (48), 129 (71), 112 (90), 100 (76).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,90 (d, 1H, J = 15 Hz, H-2), 7,48 (dd, 1H, J = 15; 11 Hz, H-3), 6,15 (dd, 1H, J = 11; 11 Hz, H-4), 5,82 (dt, 1H, J = 11; 8 Hz, H-5), 2,52 (dt, 2H, J = 7; 7 Hz, H-6), 2,35 (t, 2H, J = 7 Hz, H-7), 1,90 (t, 3H, J = 1 Hz, H-12), 5,71 (br s, 1H, NH-), 3,23 (m, 2H, H-1'), 1,58 (m, 1H, H-2'), 1,41 (m, 1H, H-3a'), 1,17 (m, 1H, H-3b'), 0,92 (t, 3H, J = 7 Hz, H-4'), 0,92 (d, 3H, J = 7 Hz, H-5').

11. Trideca-2E,7Z-dien-10,12-diinsäure-isobutylamid (Verb. P2)

Farbloses Öl; $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}$

DC : R_f = 0,21 (DC-T2)

HPLC : R_t = 11,0 min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 211 nm

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1670, 1550 (-CO-NH-); 2930 (CH); 2220, 2300 ($\text{H-C}\equiv\text{C-}$); 1635, 980 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 257 (24) $[\text{M}]^+$, 242 (13) $[\text{M-CH}_3]^+$, 228 (37), 214 (32) $[\text{M-C}_3\text{H}_7]^+$, 200 (11) $[\text{M-C}_4\text{H}_9]^+$, 185 (31) $[\text{M-C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$, 157 (51) $[\text{M-C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$, 149 (56), 129 (85), 115 (75) $[\text{M-C}_{11}\text{H}_{10}]^+$, 91 (59), 81 (76) $[\text{C}_6\text{H}_9]^+$, 69 (68), 57 (100) $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$.

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,79 (d, 1H, J = 15 Hz, H-2), 6,81 (dt, 1H, J = 15; 7 Hz, H-3), 2,19 (dt, 2H, J = 7; 7 Hz, H-4), 1,55 (m, 2H, H-5), 2,06 (dt, 2H, J = 7; 7 Hz, H-6), 5,49 (dt, 1H, J = 11; 7 Hz, H-7), 5,43 (dt, 1H, J = 11; 7 Hz, H-8), 3,00 (d, 2H, J = 6 Hz, H-9), 1,99 (s, 1H, H-13), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,16 (dd, 2H, J = 7; 7 Hz, H-1'), 1,81 (m, 1H, H-2'), 0,92 (d, 6H, J = 7 Hz, H-3', H-4').

12. Undeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A1)

Farblose Kristalle; $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$

Smp. : 69°C

DC : R_f = 0,19 (DC-T2)

HPLC : R_t = 8,2 min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Ethanol): 211 nm (ϵ = 10.600)

IR : KBr; ν = 3300, 3080, 1670, 1550 (-CO-NH-); 2950 (CH-); 2300, 2220 ($\text{H-C}\equiv\text{C-}$); 1630, 980 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 231 (1) $[M]^+$, 216 (1) $[M-CH_3]^+$, 202 (5), 188 (3) $[M-C_3H_7]^+$, 174 (3) $[M-C_4H_9]^+$, 160 (6), 159 (4) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 149 (7), 131 (20) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 116 (28), 103 (30), 91 (100) $[C_7H_7]^+$, 54 (58).

1H -NMR : 80 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,79 (dt, 1H, $J = 15$; 1 Hz, H-2), 6,83 (dt, 1H, $J = 15$; 7 Hz, H-3), 2,30 (m, 4H, H-4, H-7), 1,60 (m, 4H, H-5, H-6), 1,98 (t, 1H, $J = 1$ Hz, H-11), 5,45 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

13. Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A7)

Farbloses Öl; $C_{15}H_{21}NO$

DC : $R_f = 0,45$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 9,3$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Ethanol): 211 nm ($\epsilon = 13.600$)

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1660, 1540$ (-CO-NH-); 2950 (CH-); 2300, 2220 (H-C $\equiv$ C-); 1630, 970 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 231 (1) $[M]^+$, 216 (1) $[M-CH_3]^+$, 203 (4), 188 (3) $[M-C_3H_7]^+$, 174 (3) $[M-C_4H_9]^+$, 168 (2) $[M-C_5H_3]^+$, 159 (10) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 146 (10), 141 (9), 131 (73) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 117 (76), 103 (27), 91 (95) $[C_7H_7]^+$, 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

1H -NMR : 80 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,70 (d, 1H, $J = 11$ Hz, H-2), 5,97 (dt, 1H, $J = 11$; 7 Hz, H-3), 2,68 (dt, 2H, $J = 11$; 7 Hz, H-4), 1,60 (m, 4H, H-5, H-6), 2,26 (m, 2H, H-7), 1,95 (t, 1H, $J = 1$ Hz, H-11), 5,55 (br s, 1H, NH-), 3,14 (dd, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

14. Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-isobutylamid (Verb. A2)

Farblose Kristalle; $C_{16}H_{23}NO$

Smp. : $104^\circ C$

DC : $R_f = 0,22$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 10,2$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 211 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1670, 1550$ (-CO-NH-); 2960 (CH-); 1620, 980 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 245 (3) $[M]^+$, 230 (2) $[M-CH_3]^+$, 217 (10), 202 (5) $[M-C_3H_7]^+$, 188 (5) $[M-C_4H_9]^+$, 173 (10) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 169 (11), 149 (19), 145 (39) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 130 (30), 117 (46), 105 (30) $[C_8H_9]^+$, 91 (46) $[C_7H_7]^+$, 77 (47) $[C_6H_5]^+$, 57 (100) $[C_4H_9]^+$.

1H -NMR : 80 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,79 (dt, 1H, $J = 15$; 1 Hz, H-2), 6,83 (dt, 1H, $J = 15$; 7 Hz, H-3), 2,25 (m, 4H, H-4, H-7), 1,62 (m, 4H, H-5, H-6), 1,90 (t, 3H, $J = 1$ Hz, H-12), 5,45 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

15. Pentadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verb. A4)

Farbloses Öl; $C_{19}H_{27}NO$

DC : $R_f = 0,32$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 15,8$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 199, 211(sh) nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1670, 1550$ (-CO-NH-); 2940 (CH-); 2220 (H-C $\equiv$ C-); 1635, 980 (-C=C-).

CI-MS : NH_3 ; m/z (rel. Int.): 286 (100) $[M+H]^+$.

1H -NMR : 360 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,78 (d, 1H, $J = 15$ Hz, H-2), 6,83 (dt, 1H, $J = 15$; 7 Hz, H-3), 2,18 (dt, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-4), 1,47 (m, 2H, H-5), 1,36 (m, 4H, H-6, H-7), 2,05 (dt, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-8), 5,40 (dt, 1H, $J = 11$; 7 Hz, H-9), 5,50 (dt, 1H, $J = 11$; 7 Hz, H-10), 3,02 (d, 2H, $J = 7$ Hz, H-11), 2,01 (s, 1H, H-15), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-1'), 1,82 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

16. Hexadeca-2E,9Z-dien-12,14-diinsäure-isobutylamid (Verb. A5)

Farbloses Öl; $C_{20}H_{29}NO$

DC : $R_f = 0,37$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 18,0$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 199, 211(sh) nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1670, 1550$ (-CO-NH-); 2950 (CH-); 1630, 980 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 300 (45) $[M+H]^+$, 284 (16) $[M-CH_3]^+$, 256 (45) $[M-C_3H_7]^+$, 242 (34) $[M-C_4H_9]^+$, 216 (39), 199 (26) $[M-C_5H_{10}NO]^+$, 154

(43), 149 (53), 117 (52), 91 (49), 83 (84), 57 (100), 43 (55).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,76 (dt, 1H, $J=15$; 1 Hz, H-2), 6,83 (dt, 1H, $J=15$; 7 Hz, H-3), 2,17 (dt, 2H, $J=7$; 7 Hz, H-4), 1,40 (m, 6H, H-5, H-6, H-7), 2,02 (dt, 2H, $J=7$; 7 Hz, H-8), 5,40 (dt, 1H, $J=11$; 7 Hz, H-9), 5,46 (dt, 1H, $J=11$; 7 Hz, H-10), 2,98 (d, 2H, $J=7$ Hz, H-11), 1,90 (s, 3H, H-16), 5,50 (br s, 1H, NH-), 3,15 (dd, 2H, $J=7$; 7 Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J=7$ Hz, H-3', H-4').

17. Undeca-2Z-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verb. A9)

Farbloses Öl; $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}$

DC : $R_f = 0,50$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 11,6$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 211 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1660, 1540$ (-CO-NH-); 2960 (CH-); 2220, 2300 (H-C $\equiv$ C-); 1630 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 246 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 230 (13) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 216 (38) $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_5]^+$, 202 (10) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 188 (40) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 159 (52) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}]^+$, 131 (86) $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}]^+$, 117 (78), 104 (43), 91 (76) $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, 71 (63), 63 (48), 55 (81), 43 (97).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,70 (dt, 1H, $J=11$; 1 Hz, H-2), 5,97 (dt, 1H, $J=11$; 7 Hz, H-3), 2,68 (dt, 2H, $J=7$; 7 Hz, H-4), 1,58 (m, 4H, H-5, H-6), 2,29 (t, 2H, $J=7$ Hz, H-7), 1,96 (s, 1H, H-11), 5,43 (br s, 1H, NH-), 3,17 (m, 2H, H-1'), 1,58 (m, 1H, H-2'), 1,41 (m, 1H, H-3a'), 1,16 (m, 1H, H-3b'), 0,91 (t, 3H, $J=7$ Hz, H-4'), 0,91 (d, 3H, $J=7$ Hz, H-5').

18. Dodeca-2E-en-8,10-diinsäure-2-methylbutylamid (Verb. A3)

Farbloses Öl; $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{NO}$

DC : $R_f = 0,29$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 12,5$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 211 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1665, 1540$ (-CO-NH-); 2940 (CH-); 1620, 980 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 259 (3) $[\text{M}]^+$, 258 (5), 244 (3) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 230 (10) $[\text{M}-$

$\text{C}_2\text{H}_5]^+$, 216 (5), 202 (7) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 188 (8), 173 (10) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}]^+$, 160 (16), 145 (46) $[\text{C}_{11}\text{H}_{13}]^+$, 130 (37) $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}]^+$, 117 (77), 105 (57) $[\text{C}_8\text{H}_9]^+$, 91 (82) $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, 77 (84) $[\text{C}_6\text{H}_5]^+$, 55 (100).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,77 (dt, 1H, $J = 15$; 1 Hz, H-2), 6,81 (dt, 1H, $J = 15$; 7 Hz, H-3), 2,26 (m, 2H, H-4), 1,56 (m, 4H, H-5, H-6), 2,28 (t, 2H, $J = 6$ Hz, H-7), 1,91 (s, 3H, H-12), 5,63 (br s, 1H, NH-), 3,20 (m, 2H, H-1'), 1,56 (m, 1H, H-2'), 1,41 (m, 1H, H-3a'), 1,15 (m, 1H, H-3b'), 0,91 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H-4'), 0,91 d (d, 3H, $J = 7$ Hz, H-5').

19. Dodeca-2E,4Z,10Z-trien-8-insäure-isobutylamid (Verb. A6)

Farbloses Öl; $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}$

DC : $R_f = 0,40$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 10,3$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 231(sh), 261 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1660, 1550$ (-CO-NH-); 2960 (CH-); 1620, 990, 950 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 246 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 230 (54) $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 202 (37) $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$, 188 (44) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9]^+$, 173 (57) $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$, 145 (76) $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}]^+$, 131 (58), 117 (55), 105 (43), 91 (58), 77 (67), 66 (61), 57 (77), 41 (63).

$^1\text{H-NMR}$: 360 MHz, CDCl_3 , TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,87 (d, 1H, $J = 15$ Hz, H-2), 7,55 (dd, 1H, $J = 15$; 11 Hz, H-3), 6,17 (dd, 1H, $J = 11$; 11 Hz, H-4), 5,88 (dt, 1H, $J = 11$; 7 Hz, H-5), 2,57 (dt, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-6), 2,47 (dt, 2H, $J = 7$; 1 Hz, H-7), 5,45 (dq, 1H, $J = 11$; 1 Hz, H-10), 5,90 (m, 1H, H-11), 1,84 (dd, 3H, $J = 7$; 1 Hz, H-12), 5,57 (br s, 1H, NH-), 3,18 (dd, 2H, $J = 7$; 7 Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, H-3', H-4').

20. Dodeca-2E,4E-diensäure-isobutylamid (Verb. A10)

Farbloses Öl; $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{NO}$

DC : $R_f = 0,62$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 20,6$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Acetonitril/Wasser): 260 nm

IR : KBr; $\nu = 3300, 3080, 1650, 1545$ (-CO-NH-); 2950 (CH-); 1620, 990

(-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 251 (82) $[M]^+$, 236 (25) $[M-CH_3]^+$, 208 (10) $[M-C_3H_7]^+$, 195 (13), 179 (100) $[M-C_4H_{10}N]^+$, 152 (62), 113 (42), 96 (90), 81 (95), 67 (38), 55 (52), 41 (46).

1H -NMR : 360 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,75 (d, 1H, $J = 15$ Hz, H-2), 7,19 (dd, 1H, $J = 15; 11$ Hz, H-3), 6,13 (dd, 1H, $J = 15; 11$ Hz, H-4), 6,06 (dt, 1H, $J = 15; 7$ Hz, H-5), 2,14 (dt, 2H, $J = 7; 7$ Hz, H-6), 1,26 (m, 10H, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11), 0,88 (t, 3H, $J = 7$ Hz, H-12), 5,55 (br s, 1H, NH-), 3,16 (dd, 2H, $J = 7; 7$ Hz, H-1'), 1,80 (m, 1H, H-2'), 0,93 (d, 6H, $J = 7$ Hz, H-3', H-4').

21. (1S,7R)-Germacra-4(15),5E,10(14)-trien-1-ol (Verb. S1)

Farbloses Öl; $C_{15}H_{24}O$

DC : $R_f = 0,70$ (DC-T2)

HPLC : $R_t = 15,6$ min (HPLC-T3)

UV : λ_{max} (Hexan): 239 nm ($\epsilon = 18.300$)

IR : KBr; $\nu = 3350$ (OH-); 3080, 885 (-C=CH₂); 2950 (CH-); 1640, 1610 (-C=C-C=C-); 1380, 1360 (-CH(CH₃)₂); 970 (-C=C-).

EI-MS : m/z (rel. Int.): 220 (26) $[M]^+$, 205 (32) $[M-CH_3]^+$, 202 (55) $[M-H_2O]^+$, 192 (20), 187 (34) $[M-CH_3-H_2O]^+$, 177 (62) $[M-C_3H_7]^+$, 159 (67) $[M-C_3H_7-H_2O]^+$, 149 (63), 135 (71), 122 (73), 109 (86), 83 (94), 69 (92), 55 (99), 43 (100).

1H -NMR : 300 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 5,98 (1H, d, $J = 16$ Hz, H-5), 5,41 (1H, dd, $J = 16; 10$, H-6), 5,24 (1H, s, H-15a), 4,97 (1H, s, H-15b), 4,90 (1H, s, H-14a), 4,82 (1H, s, H-14b), 3,74 (1H, dd, $J = 12; 4$ Hz, H-1), 2,59 (1H, ddt, $J = 12; 7; 2$ Hz; H-9a), 2,41 (1H, dt, $J = 5; 13$ Hz; H-3a), 2,16 (1H, ddd, $J = 13; 6; 3$ Hz; H-3b), 2,03 (2H, m, H-2a, H-8a), 1,78 (1H, m, H-7), 1,66 (3H, m, H-2b, H-9b, H-8b), 1,47 (1H, dq, $J = 7; 13$ Hz; H-11), 0,88 (3H, d, $J = 7$ Hz; H-12), 0,79 (3H, d, $J = 7$ Hz, H-13).

^{13}C -NMR : 75 MHz, $CDCl_3$, TMS int. Stand., δ (ppm) =
 153,5 (s, C-4), 146,8 (s, C-10), 137,9 (d, C-6), 129,7 (d, C-5), 112,8 (t, C-14), 110,5 (t, C-15), 75,9 (d, C-1), 52,5 (d, C-7), 36,2 (2xt, C-8, C-2), 34,5 (t, C-9), 31,8 (d, C-11), 30,0 (t, C-3), 20,7 (q, C-12), 20,5 (q, C-13).

NOE-Daten: siehe Kap. 4.3.7.

Optische Drehung : $[\alpha]_D^{20} = -189,6^\circ$ ($c = 0,48$; Hexan)

8.8. Pharmakologische Untersuchungen

8.8.1. Carbon-Clearance-Test

Zur Herstellung der Testlösungen wurden die Reinsubstanzen, Fraktionen oder Extrakte in Ethanol bzw. Wasser gelöst. Von diesem Ansatz wurde 0,5 ml in 30 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die HPLC-Fingerprints der Alkylamidfraktion-Testlösungen von *Echinaceae purpureae radix* und *E. angustifoliae radix* entsprachen den unter 5.3.2. dargestellten Chromatogrammen. Die Anzahl der Versuchstiere betrug 8 bis 13.

Die Durchführung des Testes basiert auf den Angaben von BIOZZI und Mitarb. [114] und erfolgte entsprechend der bereits publizierten Methodik [3]. Die Testsubstanzen wurden über zwei Tage dreimal täglich verabreicht mit umgerechnet 10 ml/kg der Testlösungen. Als Kontrolle wurde physiologische Kochsalzlösung mit der entsprechenden Menge Ethanol verwendet. Die Lösungen wurden über eine Schlundsonde direkt in den Magen appliziert. Am dritten Tag erhielt jede Maus 0,3 ml Tuschesuspension (Schwarz, Nr. 591017, Rotringwerke, Riepe KG, Hamburg) pro 30 g KG i.v. injiziert. Die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus erfolgte 3, 6, 9, 12, und 15 min nach dieser Injektion. Die Kohlenkonzentration wurde jeweils photometrisch bei 650 nm bestimmt.

Aus den Extinktionswerten wurde für jede Maus die lineare Regression der Kohleausscheidung (log E gegen t) bestimmt. Die Aktivität ergibt sich aus dem Verhältnis der gemittelten Regressionskoeffizienten der mit der zu untersuchenden Substanz behandelten Gruppe von Tieren (RCtr) zu denen einer unbehandelten Kontrollgruppe (RCc). Ist $RCtr/RCc < 1,5$, so handelt es sich um eine schwache Wirkung (DSK-Note 1); ist das Verhältnis $> 1,5$, kann die Wirkung als gut beurteilt werden (DSK-Note 2).

8.8.2. Granulozyten-Ausstrichtest

Der Test wurde in einer modifizierten Methodik nach BRANDT [113] durchgeführt. Die Gewinnung der Humangranulozyten erfolgte nach WAGNER und Mitarb. [3]. Die Granulozytensuspension wurde mit PBS-Puffer (Phosphat-gepuffertes Salz) auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Als Hefesuspension wurde in isotonischer Kochsalzlösung suspendierte, auf 100°C erhitzte Bäckerhefe auf 5×10^7 Partikel/ml eingestellt. Als Versuchsansatz wurden 0,2 ml Poolserum, 0,2 ml Granulozyten- und 0,2 ml Hefesuspension mit 0,2 ml Testlösung gemischt. Die Anfärbung der Granulozyten erfolgte mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt). Es wurden bei jeder Konzentration mindestens 200 Zellen pro Objektträger ausgewertet. Als Kontrolle diente physiologische Kochsalzlösung.

Der Phagozytoseindex (PI) entspricht der mittleren Anzahl phagozytierter Hefepartikel pro Granulozyt. Die Beeinflussung der Phagozytoseaktivität errechnet sich als die prozentuale Abweichung des PI der getesteten Substanz im Vergleich zum PI der Kontrolle.

$$\text{Stim. PI [\%]} = \frac{(\text{PI Substanz} - \text{PI Kontrolle}) \times 100}{\text{PI Kontrolle}}$$

8.8.3. Chemolumineszenz-Test [116]

Zellisolierung

Zur Abtrennung der Erythrozyten wird eine Dextransedimentation vorgenommen. Die Granulozytensuspension wird durch Ficoll-Überschichtung gewonnen. Die Zelleinstellung erfolgt auf 300 Granulozyten/ μl in RPMI-Puffer.

Testansatz

Zu testende Substanz in PBS-Puffer	100 μl
Luminol (0,2 μM)	100 μl
Granulozytensuspension	100 μl
	(= 30.000 Zellen)
Veronalpuffer	660 μl

Start mit opsonisiertem Zymosan

40 μ l

Die Messungen erfolgten im 6-Kanal-Bioluminat (Fa. Beckmann) bei 37°C. Nach 60 min wurde der Lauf gestoppt.

9. Literatur

1. MOERMAN, D.E.: Medicinal Plants of Native America, Research Reports in Ethnobotany, Contrib. 2, University of Michigan Museum of Anthropology, Technical Reports 19, 156 (1986)
2. PROKSCH, A.: Dissertation München (1982)
3. WAGNER, H., PROKSCH, A., RIESS-MAURER, I., VOLLMAR, A., ODENTHAL, S., STUPPNER, H., JURCIC, K., LETURDU, M., FANG, J.N.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 35, 1069 (1985)
4. PROKSCH, A., WAGNER, H.: *Phytochemistry* 26, 1989 (1987)
5. MCGREGOR, R.L.: *The University of Kansas Science Bulletin* 48, 113 (1968)
6. DeCANDOLLE, A.P., DeCANDOLLE, A.: *Prodromus Systematis Regni Vegetabilis* 17, 1824 (1836)
7. CRONQUIST, A.: *Vasc. Pls. Pacif. Northw.* 5, 160 (1955)
8. HEUBL, G., BAUER, R., WAGNER, H.: *Sci. Pharm.* 56, 145 (1988)
9. NUTTALL, T.: *Acad. Nat. Sci. of Phil.* 7, 77 (1834)
10. MORISON, R.: *Plantarum historiae universalis*, Pt.3, Sec.6, Pl.9 (1699)
11. MOENCH, C.: *Methodas Plantas* 780p (1794)
12. FOSTER, S.: *Echinacea Exalted*, Ozark Beneficial Plant Project, Brixey, Missouri (1985)
13. KING, J., NEWTON, R.S.: *The American Eclectic Dispensatory*, H.W. Derby, Cincinnati, S. 351 (1852)
14. FELDER, H.: *Med. Klinik* 54, 525 (1959)
15. BAUER, K.M.: *Medizinische* 50, 1863 (1957)
16. HERMANN, G.: *Münch. Med. Wschr.* 94, 385 (1952)
17. TRONNIER, H.: *Münch. Med. Wschr.* 109, 2118 (1967)
18. MEISSNER, F.: Dissertation München (1980)
19. KORTING, G.W., RASP, K.: *Medizinische* 45, 1504 (1954)
20. BREHM, G.: *Ärztl. Sammelblätter* 51, 423 (1962)
21. FRANKEN, E., SÖNNICHSEN, N.: *Aesthet. Med.* 15, 242 (1966)
22. SCHNURBUSCH, F.: *Z. Laryng. Rhinol. Otol.* 34, 520 (1955)
23. BAETGEN, D.: *Med. Monatsschrift* 18, 129 (1964)
24. ZIMMERMANN, O.: *Hippokrates* 40, 233 (1969)
25. *Pharmazeutische Stoffliste*, 7. Auflage, Werbe- und Vertriebsgesellschaft Deutscher Apotheker mbH, Frankfurt/M. (1986)
26. *Präparatliste der Naturheilkunde*, 6. Jahrgang, Sommer-Verlag GmbH, Teningen (1986)
27. LLOYD, J.U.: "A Treatise on Echinacea", *Drug Treatise* No. 30, Cincinnati, Inc. (1924)
28. LLOYD, J.U.: *Pharm. Rev.* 22, 9 (1904)
29. FOSTER, S.: *Herbalgramm* 3 (1985)
30. FOSTER, S.: *Business of herbs* 8 (1985)
31. BAUER, R., KHAN, I.A., WAGNER, H.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 127, 1325 (1987)
32. BAUER, R., WAGNER, H.: *Sci. Pharm.* 55, 159 (1987)
33. KHAN, I.A.: Dissertation München (1987)
34. SCHINDLER, H.: *Pharm. Zentralh.* 81, 579-589 (1940)
35. NEUGEBAUER, H.: *Pharmazie* 4, 137 (1949)
36. HOOKER, J.W.: *Curt. Bot. Mag.* 17, 5281 (1861)
37. SCHINDLER, H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 3, 485 (1953)
38. BAUER, R., KHAN, I.A., WAGNER, H.: *Planta med.* 54, 426 (1988)
39. BAUER, R., KHAN, I.A., WAGNER, H.: *Phytochemistry* 26, 1198 (1987)
40. BOHLMANN, F., ZDERO, C.: *Chem. Ber.* 106, 1328 (1973)
41. GREGER, H., ZDERO, C., BOHLMANN, F.: *Phytochemistry* 26, 2289 (1987)

42. GREGER, H., HOFER, O., WERNER, A.: *Phytochemistry* 26, 2235 (1987)
43. GREGER, H.: *Planta med.* 50, 366 (1984)
44. JACOBSON, M.: *Science* 120, 1028 (1954)
45. JACOBSON, M.: *J. Organ. Chem.* 32, 1646 (1967)
46. BOHLMANN, F., GRENZ, M.: *Chem. Ber.* 99, 3197 (1966)
47. BOHLMANN, F., HOFFMANN, H.: *Phytochemistry* 22, 1173 (1983)
48. BOHLMANN, F., BURCKHARDT, T., ZDERO, C.: "Naturally Occurring Acetylenes", Academic Press London (1973)
49. SCHULTE, K.E., RÜCKER, G., PERLICK, J.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 17, 825 (1967)
50. VOADEN, D.J., JACOBSON, M.: *J. Med. Chem.* 15, 619 (1972)
51. JACOBSON, M., REDFERN, R.E., MILLS, G.D.: *Lloydia* 38, 473 (1975)
52. STOLL, A., RENZ, J., BRACK, A.: *Helv. Chim. Acta* 33, 1877 (1950)
53. BECKER, H., HSIEH, W.C.: *Z. Naturforsch.* 37c, 351 (1982)
54. HSIEH, W.C.: *Dissertation Heidelberg* (1984)
55. BECKER, H., HSIEH, W.C.: *Z. Naturforsch.* 40c, 585 (1985)
56. SOICKE, H., AL-HASSAN, G., GÖRLER, K.: *Planta med.* 54, 175 (1988)
57. CHEMINAT, A., ZAWATZKY, R., BECKER, H., BROUILLARD, R.: *Phytochemistry* 27, 2787 (1988)
58. MALONGA-MAKOSI, J.P.: *Dissertation Heidelberg* (1983)
59. WAGNER, H., STUPPNER, H., SCHÄFER, W., ZENK, M.H.: *Phytochemistry* 27, 119 (1988)
60. HEINZER, F., CHAVANNE, M., MEUSY, J.P., MAITRE, H.P., GIGER, E., BAUMANN, T.W.: *Pharm. Helv. Acta* 63, 132 (1988)
61. MARTIN, R.: *Dissertation Heidelberg* (1985)
62. RÖDER, E., WIEDENFELD, H., HILLE, T., BRITZ-KIRSTGEN, R.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 124, 2316 (1984)
63. MATTOCKS, A. R.: "Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids", Academic Press, London (1986)
64. KOCH, F.E.: *Hippokrates* 11, 373 (1940)
65. HEYL, F.W., STALEY, J.F.: *J. Amer. Chem. Soc.* 37, 1769 (1915)
66. GÜNTHER, E., HEEGER, E.F., ROSENTHAL, C.: *Pharmazie* 7, 24 (1952)
67. CHAPPLE, C.C.S., ELLIS, B.E.: *J. Chromatogr.* 285, 171 (1984)
68. ANDARY, C., ROUSSEL, J.L., RASCOL, J.P., PRIVAT, G.: *J. Chromatogr.* 303, 312 (1984)
69. BERKULIN, W., HONERLAGEN, H., SCHILLING, H.J.: *Farm. Tijdschr. Belg.* 61, 359 (1984)
70. BAUER, R., REMIGER, P., WAGNER, H.: *Dtsch. Apoth. Ztg.* 128, 174 (1988)
71. REMIGER, P., BAUER, R., WAGNER, H.: *Planta med.*, im Druck
72. BAUER, R., WRAY, V., WAGNER, H.: *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* 9, 220 (1987)
73. ELGASS, H., MAUTE, R., MARTIN, R., GEORGE, S.: *Labor Praxis* 6, 2 (1982)
74. SCARPATI, M.L., ORIENTE, G.: *Tetrahedron* 4, 43 (1958)
75. FEUCHT, G., HERRMANN, K., HEIMANN, W.: *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* 145, 206 (1971)
76. WOLDECKE, M., HERRMANN, K.: *Z. Naturforsch.* 29c, 360 (1974)
77. HANEFELD, M., HERRMANN, K.: *J. Chromatogr.* 123, 391 (1976)
78. SCARPATI, M.L., D'AMICO, A.: *Ric. scient.* 30, 1746 (1960)
79. SINGLETON, V.L., ZAYA, J., TROUSDALE, E.K.: *Phytochemistry* 25, 2127 (1986)
80. SINGLETON, V.L., ZAYA, J., TROUSDALE, E.: *Vitis* 25, 107 (1986)
81. HERRMANN, K. in: "Fortschritte der Chemie Organ. Naturstoffe", Hrsg. Zechmeister, L.: 35, 73-132, Springer-Verlag (1978)
82. BECKER, H. zit. nach [69]
83. STICHER, O., SALAMA, O.: *Helv. Chim. Acta* 65, 1538 (1982)
84. BIRKHOFER, L., KAISER, C., THOMAS, U.: *Z. Naturforsch.* 23b, 1051 (1968)

85. ANDARY, C., WYLDE, R., PRIVAT, G., WINTERNITZ, F.: *Phytochemistry* 21, 1123 (1982)
86. PANIZZI, L., SCARPATI, M.L.: *Gazz. chim. ital.* 84, 792 (1954)
87. FEINSTEIN, L., JACOBSON, M. in "Progress in the Chemistry of Org. Nat. Products", Hrsg. Zechmeister, L.: 10, 452, Springer-Verlag (1953)
88. WAGNER, H., BLADT, S., ZGAINSKY, E.M.: "Drogenanalyse", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1983)
89. VERELIS, C.D.: Dissertation Heidelberg (1978)
90. STAHL, E.: *Dünnschichtchromatographie; ein Laboratoriumshandbuch*, 2. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967
91. STILL, W.C., KAHN, M., MITRA, A.: *J. Organ. Chem.* 43, 2923 (1978)
92. GREGER, H.: *Pl. Syst. Evol.* 150, 1 (1985)
93. GREGER, H., HOFER, O., WERNER, A.: *Monatsh. f. Chemie* 116, 273 (1985)
94. MARTIN, R., BECKER, H.: *Phytochemistry* 24, 2295 (1985)
95. DHAR, K.L., RAINA, M.L.: *Planta med.* 23, 295 (1973)
96. WILLIAMS, D.H., FLEMING, J.: "Strukturaufklärung in der Organ. Chemie", Thieme-Verlag, Stuttgart, New York (1985)
97. BREITMAIER, E.: *Pharmazie in unserer Zeit* 13, 102 (1984)
98. FATTORUSSO, E., MAGUO, S., MAYOL, L.: *Tetrahedron Lett.* 4149 (1978)
99. BOHLMANN, F., SINGH, P., JAKUPOVIC, J.: *Phytochemistry* 21, 157 (1982)
100. GREGER, H.: pers. Mitteilung
101. UNRUH, V.: *Nat. Eclect. Med. Assn.* 7, 63 (1915)
102. KÜHN, O.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 3, 194 (1953)
103. BITTNER, E.: Dissertation Freiburg (1979)
104. CHONE, B.: *Ärztl. Forsch.* 19, 611 (1965)
105. ENBERGS, H., WOESTMANN, A.: *Tierärztl. Umschau* 41, 878 (1986)
106. BÜSING, K. H., THÜRIGEN, G.: *Allergie und Asthma* 4, 30 (1958)
107. BÜSING, K. H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2, 467 (1952)
108. KOCH, F.E., HAASE, H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2, 464 (1952)
109. WACKER, A., HILBIG, W.: *Planta med.* 33, 89 (1978)
110. ORINDA, D., DIEDERICH, J., WACKER, A.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 23, 1119 (1973)
111. EILMES, H.G.: Dissertation Frankfurt/M. (1976)
112. MÖSE, B.: *Medwelt* 1463 (1983)
113. BRANDT, L.: *Scand. J. Haematol. Suppl.* 2 (1967)
114. BIOZZI, G., BENACERRAF, B., HALPERN, B.N.: *Brit. J. Exp. Pathol.* 34, 441 (1953)
115. BAUER, R., JURCIC, K., PUHLMANN, J., WAGNER, H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 38, 276 (1988)
116. WAGNER, H., PROKSCH, A., VOLLMAR, A., KREUTZKAMP, B., BAUER, J.: *Planta med.* 2, 139 (1985)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. Hildebert Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Herrn Prof. Dr. H. Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit, seine stets großzügige Förderung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Dr. R. Bauer, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die Betreuung der Doktorarbeit, die zahlreichen Tips aus seinem Erfahrungsschatz und für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Für die freundliche Überlassung von Drogenmaterial und Vergleichssubstanzen möchte ich allen genannten Personen und Firmen danken.

Für die Aufnahme der Kernresonanz- und Massenspektren möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr. V. Wray, Fa. GBF, Braunschweig, Herrn R. Stadler, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler, Max-Planck-Institut Martinsried, Herrn Dr. O. Seligmann, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München und Herrn Ing. H. Dirks, Fa. GBF, Braunschweig.

Frau Dr. K. Jurcic und ihren Mitarbeiterinnen danke ich für die freundliche Durchführung der immunologisch-pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. S.M. Wong, University of Illinois at Chicago, USA, bin ich für die zahlreichen Anregungen aus seinem spektroskopischen Erfahrungsschatz zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. G. Heubl, Institut für Systematische Botanik der Universität München, danke ich für das Anfertigen der Habituszeichnungen.

Herrn Dr. P. Wolff danke ich für seine stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Allen Kollegen und Institutsmitarbeitern, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich nicht zuletzt meinen herzlichen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Peter Achim Remiger

Eltern :	geboren am 25.12.1959 in München Richard Remiger, Angestellter Ilse Remiger, geb.Berg
Schulausbildung:	1966 - 1970 Weißensee-Volksschule, München 1970 - 1979 Asam-Gymnasium, München Juni 1979 Abitur
Grundwehrdienst:	1979-1980
Studium der Pharmazie:	WS 1980/81 - SS 1984 an der Ludwig-Maximilians-Universität, München 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung Oktober 1984
Pharmazie-Praktikum:	Dez.1984 - Nov.1985 Sonnen-Apotheke, Neubiberg
Approbation:	Februar 1986
Wissenschaftl. Tätigkeit:	1. Februar 1986 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München

